

El ciclo estral bovino y su efecto sobre el diagnóstico de endometritis subclínica

Madoz, L.V. ^(1,2), Migliorisi, A.L. ⁽¹⁾, Bainotti, C. ⁽³⁾, Cadenas, E. ⁽³⁾ y De la Sota, R.L. ^(1,2)

Resumen

El cytobrush (CB) ha demostrado ser la mejor técnica de obtención de citologías uterinas para el diagnóstico de endometritis subclínica (ES) en vacas postparto. El diagnóstico se basa en el porcentaje de neutrófilos (PPMN) encontrados en la citología endometrial según los días postparto en que se encuentra la hembra. Sin embargo, varios autores han descrito un aumento fisiológico de neutrófilos (PMN) en el endometrio, entre fin del proestro y mediados a fines del metaestro, dicho aumento podría llegar a alterar el diagnóstico de ES, resultando en diagnósticos falsos positivos. El objetivo de este estudio fue evaluar la variación del PPMN en vacas clínicamente sanas con celos sincronizados. Se utilizaron vacas cíclicas ($n=17$) de 27-56 días postparto (dpp) al comienzo del muestreo; fueron sincronizadas mediante un protocolo de Ovsynch y se las muestreó los días 0, 4, 11 y 18 del ciclo (citología endometrial y sangre para medición de las concentraciones plasmáticas de progesterona). Los resultados demuestran que PPMN no varía a lo largo del ciclo estral ($1,51 \pm 0,50$, $P > 0,64$), y que por lo tanto, el diagnóstico de ES por la técnica de CB refleja los cambios inflamatorios que ocurren en el endometrio.

Palabras clave: citología endometrial; ciclo estral; endometritis subclínica; cytobrush; neutrófilos.

The bovine estrous cycle and its effect on diagnosis of subclinical endometritis

Summary

The cytobrush (CB) had proved to be the best technique for obtaining uterine cytology for the diagnosis of subclinical endometritis (SE) in postpartum dairy cows. The diagnosis is based on the percentage of neutrophil cells (PPMN) in an endometrial cytology smear according to days postpartum. Several authors have described a physiological increase of neutrophils (PMN) in the endometrium, from late proestrus to metestrus. This increase could eventually alter the diagnosis of ES, resulting in false positive diagnoses. The aim of this study was to evaluate the variation of PPMN in clinically healthy synchronized cows. For the experiment there were used Holstein cows between 27-56 days postpartum (dpp) at the beginning of the sampling period. They were synchronized with an Ovsynch protocol and were sampled on days 0, 4, 11 and 18 of the estrous cycle (endometrial cytology for SE diagnosis and blood for progesterone measurement). The PPMN did not change throughout the estrous cycle ($1,51 \pm 0,50$, $P > 0,64$). The results demonstrate that the PPMN does not vary along the estrous cycle, and therefore the diagnosis of ES by the CB technique reflect the inflammatory changes which occur in the endometrium.

Key words: endometrial cytology; estrous cycle; subclinical endometritis; cytobrush; neutrophils.

(1) Cátedra y Servicio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nac. de La Plata, Arg. dairydoc82@gmail.com

(2) CONICET, Av. Rivadavia 1917, Cdad. Autónoma de Bs. As, Arg.

(3) Práctica privada.

Recibido: 8 de junio de 2012.

Aceptado: 13 de agosto de 2012.

Taurus Año 14 N° 55: 36-42

Introducción

Histología del útero bovino

En un corte histológico del útero bovino se pueden distinguir tres capas: endometrio, miometrio y perimetrio. El endometrio, es la capa más interna y es la que es afectada en los casos de endometritis. En vaquillonas jóvenes, el endometrio presenta poco espesor y contenido de glándulas; estas características cambian una vez que la hembra alcanza la madurez sexual, ya que el endometrio aumenta su espesor y la cantidad de glándulas se hace más numerosa ⁽¹⁵⁾. A partir del momento en que la hembra comienza a ciclar, el útero bovino normal presenta, de manera similar a lo que sucede en otras especies, cambios estructurales fisiológicos que dependen del perfil hormonal predominante ⁽²³⁾. Dentro de ellos, los cambios más relevantes de cada fase del ciclo estral bovino de detallan a continuación.

Durante el proestro, a medida que aumenta la llegada de flujo sanguíneo al útero, el grosor del endometrio se va incrementando, principalmente debido a la proliferación celular y al edema que se presenta. El edema comienza en las partes más profundas del tejido, cercano al miometrio, y gradualmente se propaga; también comienza a notarse el crecimiento glandular aunque sin grandes ramificaciones. Además el miometrio aumenta su tonicidad y las células epiteliales superficiales que eran cúbicas al comienzo del proestro, se hacen más altas ^(1, 3, 4, 17).

Durante el estro se alcanzan los niveles máximos de edema endometrial e hiperemia; y durante el metaestro, el edema comienza a disminuir a partir del segundo día del ciclo estral debido a que hay colapso de algunos vasos sanguíneos de la mucosa ⁽¹⁾.

Durante el diestro, bajo el dominio de la progesterona, el endometrio cambia sus características hacia un epitelio de tipo secretor. Las células aumentan en tamaño y número, y es notorio el crecimiento glandular con ramificaciones y secreción. Hacia los últimos cuatro días del diestro, el endometrio comienza su regresión, las glándulas se acortan cesando su producción y el epitelio disminuye de tamaño ^(5, 17).

Junto con los cambios antes mencionados, se han descrito una mayor llegada de neutrófilos (PMN) al endometrio en determinados momentos del ciclo estral (fin del proestro a mediados o fines del metaestro). A pesar de que la existencia de variaciones en dichas células se conoce de larga

data, no hay un acuerdo total entre diferentes autores en los días exactos en que sucede el mencionado aumento ⁽⁶⁾. Por ejemplo, la mayor presencia de neutrófilos desde el fin del proestro hasta el día 3 o 4 del ciclo ha sido reportada por Dellman ⁽⁵⁾, esto coincide en gran parte con la descripción de Kojima y Selander, quienes los encontraron relacionados con el estro y el metaestro ⁽²⁰⁾. Por otro lado, la descripción de Ohtani es un ejemplo que difiere de lo anterior, ya que describe la llegada e infiltración de PMN por debajo del epitelio superficial los días 7-8 del ciclo, habiendo tomado como día 0 al comienzo del estro ⁽²³⁾.

Diagnóstico de endometritis subclínica

La citología endometrial obtenida por la técnica de cytobrush (CB) ha demostrado ser la mejor herramienta para el diagnóstico de endometritis subclínica (ES) en bovinos ^(2, 19). Se basa en la obtención de células a través de un cepillado del endometrio de vacas con ≥ 21 días postparto; es una técnica confiable y no genera distorsión celular como sucede con el lavaje uterino ⁽¹⁹⁾. Sumado a esto, la técnica de CB es de fácil aplicación, utiliza material descartable y no requiere de equipamiento costoso.

Una vez obtenida la muestra, el diagnóstico se realiza por conteo y determinación del porcentaje de neutrófilos sobre el total de células contadas (PPMN). Según el porcentaje de neutrófilos obtenido en el muestreo y la cantidad de días postparto que tiene la vaca, se clasifica a las hembras en positivas o negativas a ES.

Si bien en los últimos años algunos trabajos han utilizado la citología endometrial para el diagnóstico de ES ^(10, 12, 13, 14, 18, 22, 24, 29), a nuestro conocimiento no existen estudios sobre la variación del porcentaje de PMN durante el ciclo estral de la vaca. El hecho de que en cierto momento del ciclo se presente un mayor porcentaje de PMN en las capas más superficiales del útero, plantea la posibilidad de que el diagnóstico de ES pueda verse alterado. Como fue explicado anteriormente, el PPMN es determinante de un diagnóstico positivo o negativo a dicha afección, y un aumento fisiológico de PMN incrementaría los falsos positivos.

En resumen, conociendo que el CB es la mejor técnica para la obtención de citologías uterinas y que refleja en forma práctica los cambios a nivel endometrial, se planteó la necesidad de estudiar las

variaciones fisiológicas del PPMN durante el ciclo estral, con el objeto de poder descartar posibles falsos positivos debidos a variaciones fisiológicas de PMN. Además se planteó evaluar la variación del porcentaje de leucocitos mononucleares y del tamaño de las células endometriales a lo largo del ciclo estral en vacas sincronizadas y clínicamente sanas.

Materiales y métodos

Diseño experimental y animales

Se utilizaron hembras bovinas (*Bos taurus*) de raza Holando Argentino pertenecientes al tambo comercial Las Dos Marías ubicado en la localidad de Marcos Paz, provincia de Buenos Aires. Se utilizaron vacas en postparto (n=53) que se encontraban entre 27 y 56 días postparto (dpp) al momento del comienzo de la toma de muestras (d 0). Los animales incluidos en el experimento, debían tener una CC $\geq 2,5$, no haber padecido abortos, distocias ni retención de placenta en su último parto y encontrarse ciclando y en buen estado de salud general.

En primer lugar, se realizó el examen general del animal, la evaluación del tracto reproductivo por palpación transrectal y la evaluación del flujo vaginal recuperado mediante la técnica conocida como flujeo. Para esto, el flujo vaginal era colectado en la parte más craneal de la vagina con una mano enguantada. Luego, la misma era abierta a contraluz para permitir la evaluación del mucus^(8, 28). El flujo vaginal era clasificado en cuatro grados según sus características: flujo normal [F0], flujo con flóculos de pus [F1], flujo purulento sin olor [F2], y flujo purulento con olor fétido [F3]. Aquellos animales que presentaban F0 eran diagnosticados negativos a endometritis clínica (EC) y aquellos que presentaban F1, F2 o F3 eran diagnosticados con EC^(8, 28).

Se seleccionaron aquellas vacas sin EC, con flujo normal translúcido y sin rastros de pus (F0). Los ovarios de las vacas seleccionadas fueron evaluados mediante ecografía (Mindray™ 6600Vet, Nanshan, China; sonda de 7,5 MHz), y aquellos animales con imágenes ováricas compatibles con aciclia (ausencia de CL y de folículos mayores a 8 mm de diámetro), no fueron incluidos en el estudio.

Las vacas seleccionadas (n=30) fueron sincronizadas según el protocolo Ovsynch⁽²⁵⁾. Se les aplicó una primera dosis de 8 μg de buserelina ([Hormona liberadora de gonadotrofinas, GnRH],

Gonaxal- Biogénesis Bagó, Argentina; d -9), una dosis de 150 μg de un análogo sintético de Prostaglandina F $_{2\alpha}$ siete días más tarde (D-Cloprostenol, Enzaprost DC-Biogénesis Bagó, Argentina; d -2), y una segunda dosis de GnRH dos días más tarde (d 0). Todos los animales sincronizados (n=17) fueron muestreados el d0 (estro), d4 (metaestro), d11 (diestro), y d18 (proestro). El día 0 fue tomado como el último día de la sincronización, 12 h luego de la segunda dosis de GnRH. La disminución de la cantidad de animales seleccionados para la sincronización (n=30) y muestreados (n=17), se debió a que algunos animales no respondieron al protocolo de sincronización Ovsynch (evaluado por características del útero a la palpación transrectal) y a que otros no se encontraron presentes en el momento del muestreo, por lo que fueron descartados del estudio.

Se tomaron muestras de citología mediante la técnica de CB y de sangre por punción de la vena coccígea los días 0, 4, 11 y 18 del ciclo estral en todos los animales sincronizados. Las muestras de sangre fueron centrifugadas y almacenadas a -20 °C hasta que se realizó la medición de las concentraciones séricas de P4 mediante un kit comercial de RIA en fase sólida (Coat-A-Count, Progesterone; Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA). El coeficiente de variación intra-ensayo para el pool alto de P4 (6,45 ng/ml) fue de 5,14% y para el pool bajo de la misma hormona (0,8 ng/ml) fue de 10,21%.

Luego de la obtención de la muestra endometrial, cada cepillo fue rotado sobre un portaobjetos nuevo, los que fueron fijados para la preservación de la morfología celular y teñidos con tinción comercial diferencial rápida tipo Giemsa modificada, Tinción 15 (Biopur, Argentina). Luego se montaron usando un cubreobjetos de 50 x 25 mm, xilol y bálsamo de Canadá sintético para su conservación.

La evaluación de las muestras se hizo con microscopio óptico a 400 aumentos (Nikon Eclipse E200, Japón); para esto se contaban y diferenciaban 200 células como mínimo por preparado para así obtener el porcentaje del tipo celular sobre células totales⁽¹⁸⁾. Se determinó el PPMN y de células blancas mononucleares sobre las células totales. El conteo se realizó a ciegas por dos evaluadores y por triplicado.

Posteriormente, se tomaron fotos de las citolo-

gías endometriales a 1000 aumentos con microscopio binocular (Olympus BX40, Japón) conectado a una video cámara (Sony CCD-IRIS/RGB, Japón). El análisis de las fotografías se realizó mediante el software Apple video player (Quick Time®, Cupertino, USA; 4 fotografías por preparado) con una magnificación de 1000 aumentos. Sobre las fotos se realizó la citometría de las células endometriales con el programa ImageJ de procesamiento de imágenes de dominio público (NIH, USA). Por medio de este software, se midió área (μ^2), perímetro (μ) diámetro de Feret (μ) de 10 células endometriales por preparado.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados por los procedimientos GENMOD y MIXED de SAS⁽³⁰⁾. Se evaluaron los conteos de PMN y de células mononucleares (GENMOD, distribución binomial, función Logit), el tamaño de las células endometriales (área celular, perímetro y diámetro de Feret) y las concentraciones de P₄ sérica durante los diferentes días de muestreo (PROC MIXED para mediciones repetidas en el tiempo). Además, se utilizaron funciones polinómicas lineales, cuadráticas y cúbicas para determinar el efecto del tiempo (días del ciclo estral) sobre las variables dependientes.

Para conocer el grado de acuerdo o concordancia entre los resultados de los conteos de PMN entre evaluadores distintos y entre dos evaluaciones de la misma muestra, se calculó el índice Kappa (procedimiento FREQ de SAS.⁽²⁶⁾

Resultados

Las concentraciones séricas de P₄, variaron en forma significativa entre los días del ciclo estral (d0, 0,42 ± 0,42; d4, 1,16 ± 0,43; d11, 4,69 ± 0,44; d18, 2,85 ± 0,46 ng/ml; P < 0,01; Figura 1 A y B). Dichos cambios en las concentraciones de P₄ fueron explicados por una función polinómica cúbica (P < 0,001).

Todas las vacas muestreadas resultaron negativas a ES ya que los PPMN siempre estuvieron por debajo de los valores de corte determinados para el diagnóstico de ES (<4-8%, 21-62 dpp;⁽²¹⁾. De hecho, no se encontraron diferencias significativas en el PPMN entre los diferentes días del ciclo estral (1,51 ± 0,50, P > 0,64; Figura 1.A). El porcentaje de mononucleares, al igual que el de PMN,

tampoco mostró diferencias significativas entre los distintos días del ciclo estral (1,44 ± 0,32, P > 0,06; Figura 1.B).

La cuantificación de PMN mostró alta correlación entre dos conteos de la misma muestra por un mismo operador (índice Kappa 0,81) o por distintos operadores (índice Kappa 0,76).

El área, el perímetro y el diámetro Feret de las células endometriales no varió entre los días del ciclo estral (361,16 ± 24,26 μ^2 , P > 0,12; 74,84 ± 2,32 μ , P > 0,37; 27,76 ± 0,85 μ , P > 0,48; Tabla 1).

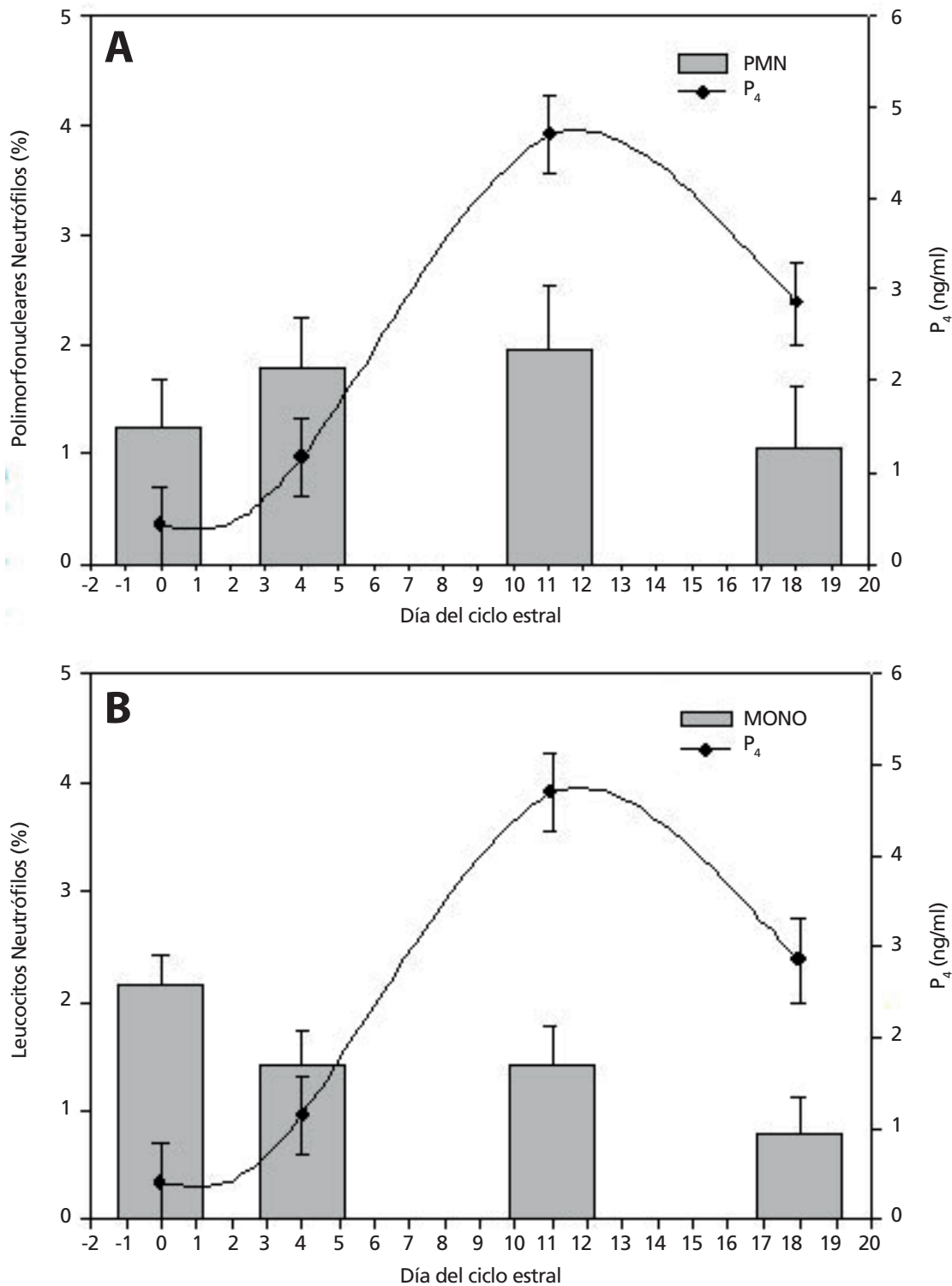
Discusión

Los resultados obtenidos muestran que el PPMN no varía a lo largo del ciclo estral en vacas ciclando y negativas a EC. Mediante el uso de un protocolo de sincronización de ovulación como el Ovsynch, fue posible sincronizar el inicio del ciclo en todas las vacas experimentales y de esta forma estudiar las variaciones de los conteos de PMN a lo largo del ciclo estral. A nuestro saber, este es el primer trabajo que ha estudiado las variaciones en el PPMN durante el ciclo estral en vacas normales sin EC.

Las concentraciones séricas de P₄ descriptas en las vacas sincronizadas mostraron variaciones de acuerdo al momento del ciclo en que se encontraban los animales en el día del muestreo, demostrando claramente la efectividad del protocolo utilizado. Dichas concentraciones estaban por debajo de 1 ng/ml en el día del celo (d0), luego fueron aumentando paulatinamente durante el metaestro (d4) hasta alcanzar su máxima concentración durante el diestro (d11) para luego descender durante el proestro (d18). La curva obtenida en este estudio coincide con las variaciones normales de concentración de P₄ durante el ciclo estral bovino reportadas previamente por otros autores^(9, 15, 16).

En varios trabajos, se han determinado los puntos de corte del conteo de PMN para el diagnóstico de ES utilizando una curva ROC (acrónimo de Receiver Operating Characteristic, o Característica Operativa del Receptor);⁽¹⁸⁾ [10-18%];⁽¹⁰⁾ [4-8,5%];⁽²¹⁾ [4-8%]; cuartiles⁽²²⁾ o un valor arbitrario⁽¹³⁾ [5%];⁽¹⁴⁾ [25%];⁽¹¹⁾ [>10%];⁽²⁴⁾ [5%]. El uso de una curva ROC es probablemente el método más adecuado para el cálculo de dichos valores de corte debido a que por un lado, permite buscar el punto de máxima sensibi-

Figura 1. Cuadrado medio mínimo (CMM) y error estándar (EE) de las concentraciones de progesterona y del PPMN (A) y de las concentraciones de progesterona y del porcentaje de leucocitos mononucleares (B) durante el ciclo estral en vacas sin EC y sincronizadas con un protocolo Ovsynch.



lidad y especificidad y por el otro lado, permite correlacionar el PPMN con el intervalo parto concepción. En aquellos estudios en los que se ha utilizado curvas ROC para determinar el punto de corte en el PPMN ^(10, 18, 21), los puntos de corte han sido siempre \geq al 4 PPMN. El hecho de que en este

estudio el PPMN durante las diferentes etapas del ciclo estral haya sido de $1,51 \pm 0,50$ confirma que la curva ROC clasifica en forma correcta las vacas con ES, y que recién a partir de 4 a 8 PPMN (según los días postparto) comienza a disminuir la fertilidad en las vacas con ES.

Tabla 1. Cuadrado medio mínimo (CMM) y error estándar (EE) de las concentraciones de progesterona y del área, perímetro y diámetro de Feret de las células endometriales durante el ciclo estral en vacas sin EC y sincronizadas con un protocolo Ovsynch.

	Día 0	Día 4	Día 11	Día 18	P
Progesterona (ng/ml)	0,42±0,42	1,16±0,43	4,69±0,44	2,85±0,46	<0,00111
Área cél. endom. (µ²)	328,4±22,33	385,3±22,6	338,9±26,3	391,9±26,3	>0,12
Perímetro cél. endom. (µ)	73,48±2,04	77,02±2,17	72,18±2,54	76,71±2,54	>0,37
(µ)	4	7	4	4	
Diám. Feret cél. endom. (µ)	27,20±0,75	27,96±0,80?	27,03±0,93	28,85±0,93	>0,48
Endometriales (µ)	5	0?	3	3	

El coeficiente Kappa permite conocer el nivel de acuerdo o concordancia entre dos evaluadores frente a una misma muestra o entre una misma muestra evaluada por un mismo evaluador en dos ocasiones diferentes. La magnitud del índice Kappa está influenciada mayormente por la extensión del acuerdo y por la prevalencia de la afección en estudio ⁽⁷⁾. Si bien el índice Kappa varía entre 0 (nulo) y 1 (máximo), cuando es mayor a 0,7 indica un alto nivel de concordancia entre los evaluadores ⁽²⁶⁾. En este estudio, cuando una misma muestra de CB fue evaluada por un mismo operador en dos momentos diferentes, el índice Kappa tuvo un valor de 0,81 demostrando un alto nivel de concordancia entre ambas lecturas del PPMN. Asimismo, cuando una misma muestra de CB fue evaluada por dos evaluadores diferentes, el índice Kappa tuvo un valor de 0,77, también demostrando un alto nivel de concordancia entre ambos evaluadores.

A pesar de que existen varios estudios publicados en los últimos años sobre el uso CB para el diagnóstico de ES, en un solo estudio previo se utilizó el índice Kappa para evaluar el grado de concordancia entre dos evaluadores frente a una misma muestra ⁽¹³⁾. En dicho estudio obtuvieron un índice Kappa mayor a 0,70 (0,86), muy similar al obtenido en este trabajo.

Los datos obtenidos en este estudio, nos permiten descartar la posibilidad de que ocurran fallas en el diagnóstico de ES en vacas en postparto debidas a cambios uterinos fisiológicos. Esto quedó principalmente demostrado al no encontrarse variaciones significativas en el PPMN a lo largo del ciclo, contrariamente a lo que se podría esperar, conociendo que existe una mayor llegada de células inflamatorias en las etapas de estro y metaestro durante el ciclo estral

normal de la hembra bovina. Probablemente dichos cambios no afectan al cepillado diagnóstico debido a que no se producen superficialmente, sino que la llegada de células inflamatorias abarca porciones más profundas del endometrio, ubicándose principalmente por debajo del epitelio superficial ⁽²³⁾, por lo que no son recogidas durante la toma de muestras. Similar explicación podría darse a la falta de variaciones significativas en el porcentaje de mononucleares a lo largo del ciclo estral.

Con respecto al tamaño de las células endometriales, este no varió significativamente a lo largo del ciclo. Si bien es conocido que el epitelio superficial uterino cambia (epitelio cilíndrico y pseudoestratificado) según el momento del ciclo y el nivel hormonal que predomine; no se han encontrado diferencias morfológicas en las células medidas en el extendido citológico obtenido con el CB. Esto puede ser debido a que las mediciones de área, perímetro y diámetro de Feret de las células endometriales fueron tomadas directamente sobre los frotis donde puede ser que estas no conserven sus dimensiones originales.

Los resultados demuestran que a pesar de los cambios cíclicos fisiológicos que ocurren en el útero, el diagnóstico de ES por la técnica de CB, no se encuentra alterado y que el mismo refleja los cambios inflamatorios que ocurren en el endometrio.

Conclusiones

Los resultados de este estudio demuestran que el PPMN no varía a lo largo del ciclo estral en vacas normales sin EC, y que por lo tanto el diagnóstico de ES por la técnica de CB refleja los cambios inflamatorios que ocurren en el endometrio.

Agradecimientos

Este proyecto fue realizado con fondos del Proyecto de Incentivos 11/V164 dirigido por RLS.

Bibliografía

1. Asdell, S.A. 1955. The estrous cycle, In: Cattle fertility and sterility. 61-71.
2. Barlund, C.S., Carruthers, T.D., Waldner, C.L., Palmer, C.W., 2008. A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology* 69, 714-723.
3. Bonafos, L.D., Kot, K., Ginther, O.J., 1995. Physical characteristics of the uterus during the bovine estrous cycle and early pregnancy. *Theriogenology* 43, 713-721.
4. Constantin, A., Meissonnier, E., 1981. L'uterus de la vache : anatomie, physiologie, pathologie. Societé Française de Buiatrie, Maisons-Alfort (Paris), 355 p. p.
5. Dellmann, D., Brown, E. 1993. Sistema Reprodutor Femenino, In: Acribia (Ed.) *Histologia Veterinaria*. Zaragoza.
6. Dhaliwal, G.S., Murray, R.D., Woldehiwet, Z., 2001. Some aspects of immunology of the bovine uterus related to treatments for endometritis. *Anim Reprod Sci* 67, 135-152.
7. Dohoo, I., Martin, W., Stryhn, H., 2003. Veterinary epidemiology research. University of Prince Edward Island, Canada.
8. Dominguez, G., Magnasco, M., Magnasco, R., Hernandez, J., Risco, C., de la Sota, R., 2006. Effect of clinical endometritis on reproductive performance in Holstein cows in Argentina. *Theriogenology* 66, 679-680.
9. Forde, N., Beltman, M.E., Lonergan, P., Diskin, M., Roche, J.F., Crowe, M.A., 2011. Oestrous cycles in Bos taurus cattle. *Anim Reprod Sci* 124, 163-169.
10. Galvão, K., Frajblat, M., Brittin, S., Butler, W., Guard, C., Gilbert, R., 2009 Effect of prostaglandin F_{2α} on subclinical endometritis and fertility in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92, 4906-4913.
11. Galvão, K.N., Flaminio, M.J.B.F., Brittin, S.B., Sper, R., Fraga, M., Caixeta, L., Ricci, A., Guard, C.L., Butler, W.R., Gilbert, R.O., 2010. Association between uterine disease and indicators of neutrophil and systemic energy status in lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 93, 2926-2937.
12. Galvão, K.N., Santosa, N.R., Galvão, J.S., Gilbert, R.O., 2011. Association between endometritis and endometrial cytokine expression in postpartum Holstein cows. *Theriogenology* 76, 290-299.
13. Gilbert, R.O., Shin, S.T., Guard, C.L., Erb, H.N., Frajblat, M., 2005. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology* 64, 1879-1888.
14. Hammon, D.S., Evjen, I.M., Dhiman, T.R., Goff, J.P., Walters, J.L., 2006. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Vet Immunol Immunopathol* 113, 21-29.
15. Hansel, W. 1959. The estrous cycle of the cow, In: Cole and Cupps (Ed.) *Reproduction in domestic animals*. New York, 235-238.
16. Hansel, W., Convey, E.M., 1983. Physiology of the estrous cycle. *J Anim Sci* 57 Suppl 2, 404-424.
17. Jones, T., Hunt, R., 1997. *Patología veterinaria*. Hemisferio Sur, Buenos Aires.
18. Kasimanickam, R., Duffield, T.F., Foster, R.A., Gartley, C.J., Leslie, K.E., Walton, J.S., Johnson, W.H., 2004. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology* 62, 9-23.
19. Kasimanickam, R., Duffield, T.F., Foster, R.A., Gartley, C.J., Leslie, K.E., Walton, J.S., Johnson, W.H., 2005. A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. *The Canadian veterinary journal*. *La revue veterinaire canadienne* 46, 255-259.
20. Kojima, Y., Selander, U., 1969. Cyclical changes in the fine structure of bovine endometrial gland cells *Cell and Tissue Research* 104 69-86.
21. Madoz, L., Ploentzke, J., Dominguez, G., Jaureguiberry, M., Suzuki, K., Drillich, M., Heuwieser, W., De la Sota, R. 2010. Effect of subclinical endometritis on reproductive performance in dairy cows in Argentina. In: XXVI World Buiatrics Congress, Santiago, Chile.
22. McDougall, S., Hussein, H., Aberdein, D., Buckle, K., Roche, J., Burke, C., Mitchell, M., Meier, S., 2011. Relationships between cytology, bacteriology and vaginal discharge scores and reproductive performance in dairy cattle. *Theriogenology* 76, 229-240.
23. Ohtani, S., Okuda, K., Nishimura, K., Mohril, S., 1993. Histological changes in bovine endometrium during the estrous cycle. *Theriogenology* 39, 1033-1042.
24. Plontzke, J., Madoz, L.V., De la Sota, R.L., Drillich, M., Heuwieser, W., 2010. Subclinical endometritis and its impact on reproductive performance in grazing dairy cattle in Argentina. *Anim Reprod Sci* 122, 52-57.
25. Pursley, J.R., Wiltbank, M.C., Stevenson, J.S., Ottobre, J.S., Garverick, H.A., Anderson, L.L., 1997. Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. *J Dairy Sci* 80, 295-300.
26. SAS 2009. Inter-Rater Reliability/KAPPA using SAS PROC FREQ.
27. SAS 2011. SAS/STAT(R) 9.2 User's Guide, Second Edition. The GENMOD Procedure.
28. Sheldon, I.M., Lewis, G.S., LeBlanc, S., Gilbert, R.O., 2006. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology* 65, 1516-1530.
29. Westermann, S., Drillich, M., Kaufmann, T.B., Madoz, L.V., Heuwieser, W., 2010. A clinical approach to determine false positive findings of clinical endometritis by vaginoscopy by the use of uterine bacteriology and cytology in dairy cows. *Theriogenology* 74, 1248-1255.
30. Wolfinger, R., Chang, M. 1995. Comparing the SAS GLM and MIXED Procedures for Repeated Measurements Analysis. In: SUGI Proceedings.