

CAMBIOS EN LA CITOLOGÍA ENDOMETRIAL DURANTE EL CICLO ESTRAL EN VACAS DE TAMBO

CHANGES IN ENDOMETRIAL CYTOLOGY DURING THE ESTROUS CYCLE IN DAIRY COWS

Laura Vanina MADDOZ^{1,2}; María JAUREGUIBERRY^{1,2}; Ana Lorena MIGLIORISI¹; Rodolfo Luzbel DE LA SOTA^{1,2}

1. Cátedra y Servicio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

2. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

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 polimorfo nucleares neutrófilos (%PMNN) 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 polimorfo nucleares neutrófilos (PMNN) en el endometrio, entre fin del proestro a fines del metaestro, que podría llegar a alterar el diagnóstico de ES resultando en diagnósticos falsos positivos. El objetivo de este estudio fue evaluar a través de citología endometrial, las variaciones de los porcentajes de PMNN, de leucocitos mononucleares y del tamaño de las células endometriales a lo largo del ciclo estral en vacas clínicamente sanas y con celos sincronizados. Se utilizaron vacas Holstein cíclicas (n= 17) de 27-56 días postparto (dpp) al comienzo del muestreo; fueron sincronizadas mediante un protocolo de Ovsynch y se las muestreó a los días 0, 4, 11 y 18 del ciclo (citología endometrial y sangre para medición de las concentraciones séricas de progesterona). Los resultados encontrados mostraron que no hay variaciones significativas por lo que el %PMNN no varía a lo largo del ciclo estral ($1,51 \pm 0,50$, $P > 0,64$), y por lo tanto, el diagnóstico de ES por la técnica de CB refleja los cambios inflamatorios que ocurren en el endometrio.

Palabras claves: cepillado endometrial, ciclo estral, citología, endometritis subclínica, neutrófilos.

ABSTRACT.

The cytobrush (CB) has 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 assessing the percentage of neutrophil cells (%PMNN) in an endometrial cytology smear according to days postpartum. Several authors have described a physiological increase of neutrophils (PMNN) 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 percentage of PMNN, mononuclear leukocytes cells and the size of endometrial cells in clinically healthy synchronized cows. For the experiment, Holstein dairy cows between 27-56 days postpartum (dpp) at the beginning of the sampling period were used. The cows 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). Data obtained showed that %PMNN did not change throughout the estrous cycle (1.51 ± 0.50 , $P > 0.64$). These results demonstrate that the %PMNN does not vary along the estrous cycle, and therefore diagnosis of ES by CB technique reflects the inflammatory changes occurred in the endometrium.

Keywords: endometrial cytology, estrous cycle, subclinical endometritis, cytobrush, neutrophils.

Recibido abril 17, 2015 - Aceptado diciembre 4, 2015

INTRODUCCIÓN

En un corte histológico del útero bovino se pueden distinguir tres capas: endometrio, miometrio y perimetrio. 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 se incrementa el número de glándulas (1). 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 y fisiológicos que dependen del perfil hormonal predominante (2). Dentro de estos cambios, se han descrito una mayor llegada de polimorfo nucleares neutrófilos (PMNN) al endometrio en determinados momentos del ciclo estral (fin del proestro hasta fines del metaestro). A pesar de que la existencia de variaciones en dichas células se conoce de larga data, no hay acuerdo entre los diferentes autores en los días exactos en que sucede el mencionado aumento (3). Para Dellman (4), la mayor presencia de PMNN se encuentra desde el fin del proestro hasta el día 3 o 4 del ciclo, esto coincide en gran parte con la descripción de Kojima y Selander (5), quienes encontraron el incremento de PMNN relacionado con el estro y el metaestro. En contraposición, Ohtani (2) difiere de lo anterior, ya que describe la llegada e infiltración de PMNN subyacente al epitelio superficial entre los días 7-8 del ciclo, habiendo tomado como día 0 el comienzo del estro.

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 (6, 7). 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 (7). 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 polimorfo nucleares neutrófilos sobre el total de células contadas (%PMNN). Según este porcentaje 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 (8-13), no existen estudios sobre la variación del porcentaje de PMNN durante el ciclo estral de la vaca. El hecho de que en cierto momento del ciclo se presente un mayor porcentaje de PMNN en las capas más superficiales del útero, plantea la posibilidad que el diagnóstico de ES pueda verse alterado ya que el %PMNN es determinante de un diagnóstico positivo o negativo a dicha afección, y un aumento fisiológico de PMNN incrementaría los falsos positivos.

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 %PMNN y de leucocitos mononucleares durante el ciclo estral, con el objetivo de poder descartar posibles falsos positivos. Asimismo, debido a que no existen estudios que determinen variaciones en la morfometría de las células endometriales sobre extendidos citológicos en relación a los diferentes estadios del ciclo estral, se decidió evaluar el área, el perímetro y el diámetro de Feret (máxima dimensión medida en una dirección fija)

de las células endometriales, con el fin de determinar la existencia de cambios morfométricos característicos en la citología uterina según el momento del ciclo; todo esto en vacas sincronizadas y clínicamente sanas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental y animales

Se utilizaron hembras bovinas (*Bos taurus*) de raza *Holstein* pertenecientes a un tambo comercial ubicado en la localidad de Marcos Paz, provincia de Buenos Aires. Se utilizaron vacas (n= 53) que se encontraban entre 27 y 56 días postparto (dpp) al comienzo de la extracción de las muestras (d0). Los animales incluidos en el experimento, debían tener una condición corporal $\geq 2,5$, no haber padecido abortos, distocias ni retención de placenta en su último parto, encontrarse ciclando y en buen estado de salud general.

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, a través de palpación vaginal, se colectó flujo de la parte más craneal de la vagina. Luego, el mismo fue evaluado y 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 (14, 15).

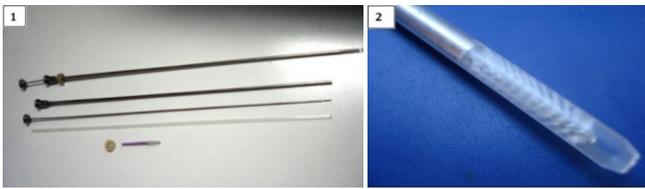
Se seleccionaron aquellas vacas sin EC, con flujo normal translúcido y sin rastros de pus (F0). Los ovarios de las vacas seleccionadas fueron evaluados mediante ecografía (Mindray™ 6600Vet, Nanshan, China; sonda de 7,5 MHz), y aquellos animales con imágenes ováricas compatibles con aciclia (ausencia de cuerpos lúteos y de

foliculos mayores a 8 mm de diámetro) no fueron incluidos en el estudio.

Las vacas seleccionadas (n= 30) fueron sincronizadas según el protocolo Ovsynch (16). 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 F2α 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 hs. posteriores a 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 Ovsynch de sincronización (evaluado por características del útero a la palpación transrectal) y a que otros no se encontraron presentes en el momento de la toma de muestras, 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 (Fig. 1, 2 y 3).

Las muestras de sangre fueron centrifugadas y almacenadas a -20° C hasta que se realizó la medición de las concentraciones séricas de progesterona (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%.



Figuras 1 y 2. Instrumental utilizado para realizar el cepillado del endometrio. (1) Pistoleta armada y por debajo, las partes que la forman. (2) Porción anterior de la pistola, donde se observa el cepillo y la vaina que lo recubre.



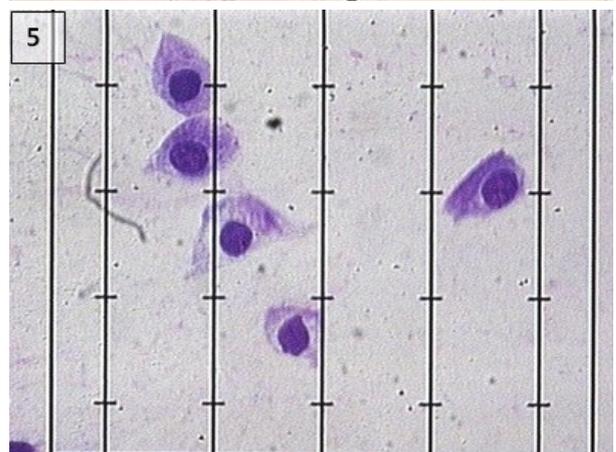
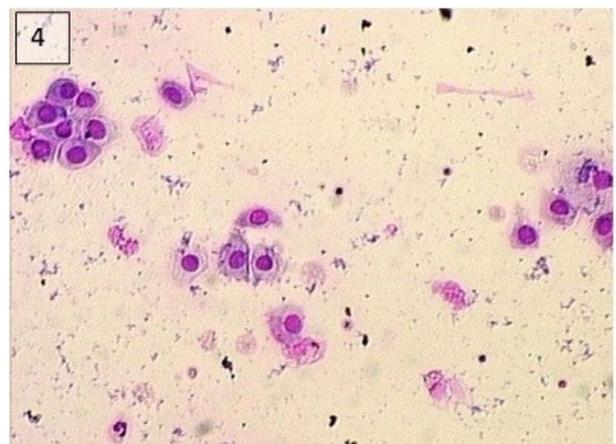
Figura 3. Pistoleta para realizar el cepillado del endometrio en un tracto reproductivo bovino. Porción anterior de la pistola con el cepillo exteriorizado listo para realizar la toma de muestra de citología endometrial.

Luego de la obtención de la muestra endometrial, cada cepillo fue rotado sobre un portaobjetos nuevo, que fue fijado para la preservación de la morfología celular y teñidos con una tinción comercial diferencial rápida tipo Giemsa modificada, la Tinción 15 (Biopur, Argentina). Luego se montaron usando un cubreobjetos de 50x25 mm, xilol y bálsamo de Canadá sintético para su conservación.

La evaluación de las muestras se llevó a cabo con microscopio de campo claro (Nikon Eclipse E200, Japón) a una magnificación final de 400x; se realizó el conteo manual y diferenciación de 200 células por preparado siguiendo un patrón de guarda griega, para así obtener el porcentaje del tipo celular sobre células totales. Se determinó el %PMNN y de leucocitos mononucleares sobre las células totales, el conteo se realizó a ciegas por

dos evaluadores y por triplicado (Fig. 4).

Posteriormente, se tomaron fotos de las citologías endometriales a 1000x 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 final de 1000x (Fig. 5). Sobre las fotos se realizó la morfometría de las células



Figuras 4 y 5. Fotografías de extendidos citológicos. Células endometriales, visualización con magnificación final de 400x y 1000x respectivamente.

endometriales con el programa ImageJ de procesamiento de imágenes y de dominio público (NIH, USA). Por medio de este software, se midió área (μm^2), perímetro (μm) y diámetro de Feret (μm) de 10 células endometriales por preparado.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados por los procedimientos GENMOD y MIXED de SAS (17, 18). Se evaluaron los conteos de PMNN 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 PMNN entre evaluadores distintos y entre dos evaluaciones de la misma muestra, se calculó el índice Kappa (procedimiento FREQ de SAS) (19).

RESULTADOS

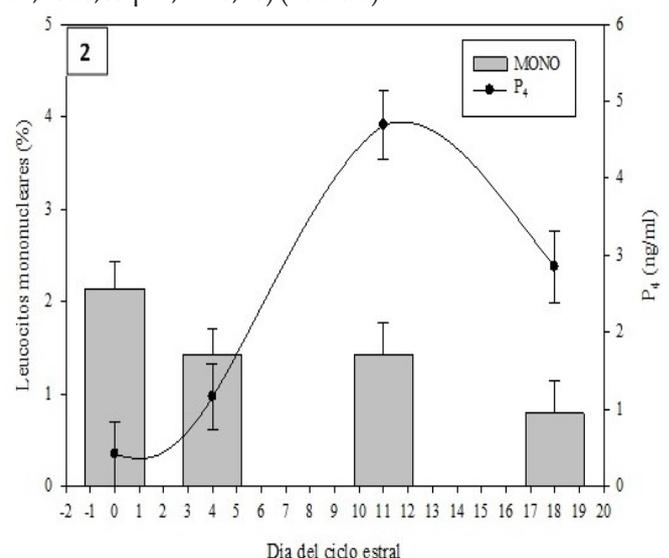
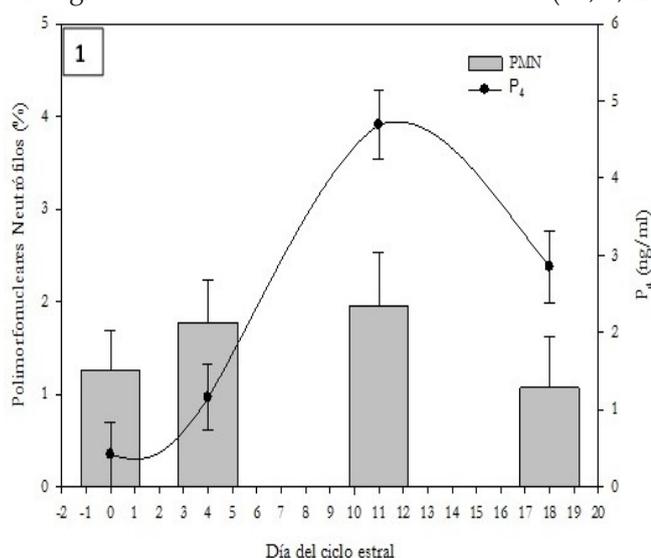
Las concentraciones séricas de P4, variaron en forma significativa entre los días del ciclo estral (d0, 0,42

$\pm 0,42$; d4, $1,16 \pm 0,43$; d11, $4,69 \pm 0,44$; d18, $2,85 \pm 0,46$ ng/mL; $P < 0,01$). Dichos cambios en las concentraciones de P4 fueron explicados por una función polinómica cúbica ($P < 0,001$).

Todas las vacas analizadas 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) (20) y no se encontraron diferencias significativas en el %PMNN entre los diferentes días del ciclo estral ($1,51 \pm 0,50$, $P > 0,64$; Gráfico 1). El porcentaje de mononucleares, al igual que el de PMNN, tampoco mostró diferencias significativas entre los distintos días del ciclo estral ($1,44 \pm 0,32$, $P > 0,06$; Gráfico 2).

La cuantificación de PMNN 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 ($361,16 \pm 24,26 \mu\text{m}^2$, $P > 0,12$; $74,84 \pm 2,32 \mu\text{m}$, $P > 0,37$; $27,76 \pm 0,85 \mu\text{m}$, $P > 0,48$) (Tabla 1).



Gráficos 1 y 2. Cuadrado medio mínimo (CMM) y error estándar (EE) de las concentraciones de progesterona y del PPMN (1) y de las concentraciones de progesterona y del porcentaje de leucocitos mononucleares (2) 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 (µm ²)	328,4±22,33	385,3±22,6	338,9±26,3	391,9±26,3	>0,12
Perímetro (µm)	73,48±2,04	77,02±2,17	72,18±2,54	76,71±2,54	>0,37
Diámetro Feret (µm)	27,20±0,75	27,96±0,80	27,03±0,93	28,85±0,93	>0,48

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.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran que el %PMNN 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 PMNN a lo largo del ciclo estral. A nuestro saber, este es el primer trabajo que ha estudiado las variaciones en el %PMNN durante el ciclo estral en vacas normales sin EC.

Las concentraciones séricas de P4 descritas en las vacas sincronizadas presentaron 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 (1, 21, 22).

En varios trabajos, se han determinado los puntos de corte del conteo de PMNN para el diagnóstico de ES utilizando una curva ROC (acrónimo de *Receiver Operating Characteristic*, o Característica Operativa del Receptor); (13) (10-18%); (9) (4-8,5%); (23) (4-8%); cuartiles (12) o un valor arbitrario (24) (5%); (25) (25%); (26) (>10%); (11) (5%). El uso de una curva ROC es probablemente el método más adecuado para el cálculo de dichos valores de corte debido a que, permite buscar el punto de máxima sensibilidad y especificidad y permite además correlacionar el %PMNN con el intervalo parto concepción. En aquellos estudios en los que se han utilizado curvas ROC para determinar el punto de corte en el %PMNN (9, 13, 23), los puntos de corte han sido siempre \geq al 4%. El hecho de que en este estudio el %PMNN durante las diferentes etapas del ciclo estral haya sido de 1,51±0,50 confirma que la curva ROC clasifica en forma correcta las vacas con ES, y que recién a partir de 4 a 8%PMNN (según los días postparto) comienza a disminuir la fertilidad en las vacas con ES.

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 (27). 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 (19). 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 %PMNN. 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 (24). En dicho estudio obtuvieron una buena correlación, con un índice Kappa de 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 %PMNN 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 diagnóstico de ES por CB 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 (2), 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 medidas en el extendido citológico a lo largo del ciclo, no se encontraron diferencias morfológicas significativas. 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 %PMNN 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.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hansel W (1959) The estrous cycle of the cow. En: *Reproduction in domestic animals*, Cole HH y Cupps PT (eds), Academic Press, New York, pp. 235-238.
2. Ohtani S, Okuda K, Nishimura K, Mohri S (1993) Histological changes in bovine endometrium during the estrous cycle. *Theriogenology* 39: 1033-1042.
3. Dhaliwal GS, Murray RD, Woldehiwet Z (2001) Some aspects of immunology of the bovine uterus related to treatments for endometritis. *Anim Reprod Sci* 67(3-4): 135-152.
4. Dellmann D, Brown E (1993) Sistema Reproductor Femenino. En: *Histología Veterinaria*, Acribia, Zaragoza, España.
5. Kojima Y, Selander U (1969). Cyclical changes in the fine structure of bovine endometrial gland cells. *Cell and Tissue Research* 104 (1): 69-86.
6. Barlund CS, Carruthers TD, Waldner CL, Palmer CW (2008) A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology* 69(6): 714-723.

7. Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley C J, Leslie KE, Walton JS, Johnson WH (2005) A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. *Can Vet J* 46(3): 255-259.
8. Westermann S, Drillich M, Kaufmann TB, Madoz LV, 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(7): 1248-1255.
9. Galvão K, Frajblat M, Brittin S, Butler W, Guard C, Gilbert R (2009) Effect of prostaglandin F2 α on subclinical endometritis and fertility in dairy cows. *J Dairy Sci* 92: 4906-4913.
10. Galvão K, Santosa N, Galvão J, Gilbert R (2011) Association between endometritis and endometrial cytokine expression in postpartum Holstein cows. *Theriogenology* 76: 290-299.
11. Plontzke J, Madoz LV, De la Sota RL, Drillich M, Heuwieser W (2010) Subclinical endometritis and its impact on reproductive performance in grazing dairy cattle in Argentina. *Anim Reprod Sci* 122(1-2): 52-57.
12. 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(2): 229-240.
13. Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton J, Johnson WH (2004) Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology* 62(1-2): 9-23.
14. Dominguez G, Magnasco M, Magnasco R, Hernandez J, Risco C, de la Sota RL (2006) Effect of clinical endometritis on reproductive performance in Holstein cows in Argentina. *Theriogenology* 66: 679-680.
15. Sheldon IM, Lewis GS, LeBlanc S, Gilbert R (2006) Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology* 65(8): 1516-1530.
16. Pursley JR, Wiltbank MC, Stevenson JS, Ottobre JS, Garverick HA, Anderson L (1997) Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. *J Dairy Sci* 80(2): 295-300.
17. SAS, SAS/STAT(R) 9.2 (2011) The GENMOD Procedure. En: SAS User's Guide, Second Edition.
18. Wolfinger R, Chang M (1995) Comparing the SAS GLM and MIXED Procedures for Repeated Measurements Analysis. En: SUGI Proceedings.
19. SAS (2009) Inter-Rater Reliability/KAPPA using SAS PROC FREQ. (En línea) <http://www.statutorials.com/SAS/TUTORIAL-KAPPA.htm>.
20. Madoz LV, Giuliadori M J, Jaureguiberry M, Plontzke J, Drillich M, De la Sota RL (2013) The relationship between endometrial cytology during estrous cycle and cutoff points for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows. *J Dairy Sci* 96(7): 4333-4339.
21. Hansel W, Convey EM (1983) Physiology of the estrous cycle. *J Anim Sci* 57(2): 404-424.
22. Forde N, Beltman ME, Lonergan P, Diskin M, Roche JF, Crowe M (2011) Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Anim Reprod Sci* 124(3-4): 163-169.
23. Madoz LV, Plontzke J, Dominguez GA, Jaureguiberry M, Suzuki K, Drillich M, Heuwieser W, De la Sota RL (2010) Effect of subclinical endometritis on reproductive performance in dairy cows in Argentina. XXVI World Buiatrics Congress. Santiago, Chile, noviembre 14-18. Santiago, comunicacion N°95.
24. Gilbert RO, Shin ST, Guard CL, Erb HN, Frajblat M (2005) Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology* 64: 1879-1888.
25. Hammon DS, Evjen IM, Dhiman TR, Goff JP, Walters JL (2006) Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Vet Immunol Immunopathol* 113(1-2): 21-29.
26. Galvão KN, Flaminio MJ, Brittin SB, Sper R, Fraga M, Caixeta L, Ricci A, Guard CL, Butler W, Gilbert R (2010) Association between uterine disease and indicators of neutrophil and systemic energy status in lactating Holstein cows. *J Dairy Sci* 93(7): 2926-2937.
27. Dohoo I, Martin W, Stryhn H (2003) *Veterinary epidemiology research*, ed. AVC. Inc, University of Prince Edward Island, Canadá.