



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**



Trabajo de tesis presentado para optar por el título
de DOCTORA EN CIENCIAS VETERINARIAS

**CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL MOCO CÉRVICO-
VAGINAL DE VACAS LECHERAS HOLANDO ARGENTINO CON
ENDOMETRITIS SUBCLÍNICA**

Autora: Med. Vet. Caren Luciana Savia

Director: Dr. Guibert Edgardo Elvio

Codirector: Dr. Rinaudo Agustín

Lugar de Trabajo:

Cátedra de Histología II y Embriología Especial

Facultad de Cs. Veterinarias UNR

**Centro Binacional (Argentina - Italia) de Investigaciones
en Criobiología Clínica y Aplicada**



Miembros del Jurado:

Dr. Marini Pablo Roberto

Dra. María Laura Fischman

Dr. Quinteros Pozo Orlando Roberto

2023

Agradecimientos

- * A mi director Edgardo E. Guibert, quien me orientó en el proceso de formación doctoral con su paciencia y empatía, creando un ambiente muy agradable de trabajo y quien siempre me brindó su sabiduría, ayudándome a crecer profesionalmente

- * A mi codirector Agustín Rinaudo, por brindarme todo el conocimiento sobre la temática y ayudarme siempre ante mis dudas y problemáticas a resolver, así como por acompañarme continuamente en el proceso de formación docente.

- * A la Universidad pública Argentina, ya que la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Rosario me permitió obtener mi título de grado y posgrado.

- * Al CONICET por otorgarme una beca doctoral para poder realizar la carrera de doctorado.

- * A la Cátedra de Histología II y Embriología Especial, lugar de trabajo en docencia e investigación, donde comparto la mayor parte de mi tiempo, en la cual encontré docentes referentes que me enseñaron y formaron; Pablo, Ariel, Marcelo, Agustín, Andrés. Así como compañeros docentes que siempre estuvieron en el proceso con mates y palabras de aliento; Lautaro, Mariano, Camila, Sacha, Manuel, Marina, Andrea, Gabriela, Belén y todos los auxiliares de cátedra, los más jóvenes; Ana, Lucio, Florencia, Lucrecia, Marianela, Santiago, Lino, Luciana, Agustina. Además, agradezco a todos los que me ayudaron en la toma de muestras y en ensayos de laboratorio, ya que fueron esenciales para el proyecto.

- * A los integrantes del CAIC: Joaquín, quien siempre me brindo su conocimiento e introdujo en el mundo de la bioquímica desde mis inicios en la beca CIN, Celeste, Juliana y Leonardo, quienes estuvieron atentos a todas mis dudas, me capacitaron y siempre colaboraron conmigo en el laboratorio, así como mis compañeros becarios de CONICET Matías y Carla. Sobre todo, les agradezco por compartir conmigo su forma de llevar adelante la investigación científica.

- * A Pipina y Pablo, por invitarme a participar en investigación cuando estaba cursando mis estudios de grado y ser quienes me acompañaron en los inicios de mi formación en reproducción bovina.

- * A los propietarios de los establecimientos; Matías D'Angelo, José Luis Fernández y FCV, por permitirme realizar el muestreo, ya que sin ustedes no habría sido posible realizar este trabajo.

- * A mis padres; Gerardo y Ana, por darme todo su amor, siempre incentivarme a crecer y perseguir mis sueños. Por ayudarme a lograrlos.

- * A mi compañero de vida Walter, por estar siempre al pie del cañón, soportando mis altibajos en el proceso y brindándome todo su amor incondicionalmente. Así como su familia que siempre me dio todo su cariño y contención.

- * A mis amigos de la vida Virginia, Ana, Matías, Romina, Eugenia, Carla, Juliana, Malena, Mailén, Maela y Ayelén que siempre estuvieron apoyándome y alentándome en el camino.

PRESENTACIONES PARCIALES DE LA TESIS

Artículos en Revistas

-SAVIA, C. L., ALGAÑARAZ, A. C., ROCA, M., TOBIN, M., RINAUDO, A., GUIBERT, E. E. “**RELACIÓN ENTRE LAS CARACTERÍSTICAS DEL FONDO DE EXTENDIDO DE MOCO CÉRVICO-VAGINAL BOVINO Y EL ESTATUS SANITARIO UTERINO**”. Enviado a publicar en revista Spermova el 17-3-23.

-SAVIA, C. L., OSORIO, J. S., RODRÍGUEZ, J. V., GUIBERT, E. E., & RINAUDO, A. “**A SIMPLE AND RELIABLE FRACTOMETRIC METHOD TO DETERMINE THE TOTAL SOLIDS CONCENTRATION OF THE CERVICO-VAGINAL BOVINE MUCUS SIMPLES**”. Heliyon 2021, 7(5), e07010. ISSN 2405-8440.

Comunicaciones en Jornadas y Congresos

- **SAVIA, C.L.**, ALGAÑARAZ, A.C, ROCA M.A, TOBIN M, GUIBERT E.E, RINARUDO, A. (2022) “**RELACIÓN ENTRE LA LECTURA DE FONDO DE EXTENDIDO DE MOCO CÉRVICO-VAGINAL BOVINO CON EL ESTATUS SANITARIO UTERINO**”. En libro de Resúmenes: XXII Jornadas de Divulgación Técnico - Científicas 2022 Facultad de Ciencias Veterinarias – UNR. ISBN 978-987-702-616-0. Pág. 333. Casilda (Argentina).

- **SAVIA, C.L.**, MARI G, ROCA M.A, TOBIN M, RINAUDO, A, GUIBERT, E.E. (2021) “**PREVALENCIA DE ENDOMETRITIS EN ESTABLECIMIENTOS LECHEROS INTENSIVOS Y SEMI-INTENSIVOS DE ITALIA Y ARGENTINA**”. En libro de Resúmenes: XV Jornadas de Ciencia y Tecnología 2021.

Universidad Nacional de Rosario, Secretaría de Ciencia y Tecnología. ISBN 978-987-702-531-6. Pág. 48. Rosario (Argentina).

- **SAVIA, C.L.**, MARI G, ROCA M.A, TOBIN M, RINAUDO, A, GUIBERT, E.E. (2021) **“PREVALENCIA DE ENDOMETRITIS EN ESTABLECIMIENTOS LECHEROS INTENSIVOS Y SEMI-INTENSIVOS DE ITALIA Y ARGENTINA”**. En libro de Resúmenes: XXI Jornadas de Divulgación Técnico - Científicas 2021 Facultad de Ciencias Veterinarias – UNR. ISBN 978-987-702-552-1. Pág. 218 Casilda (Argentina).

-**SAVIA C.L.**, MEURZET C.G.; CERUTI P.; JUAN DE PAZ L.; RINAUDO A.; GUIBERT E.E. (2020) **“ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DE IONES Y UTILIZACIÓN DE TIRAS REACTIVAS DE ORINA EN MOCO CÉRVICO VAGINAL DE VACAS CON ESTATUS UTERINO SANOS Y CON ENDOMETRITIS”**. En libro de Resúmenes: Primer encuentro virtual de divulgación y comunicación de ciencias veterinarias 2020. Facultad de Ciencias Veterinarias - UNR. ISBN 9789877024351. Pág. 183. Casilda (Argentina).

-**SAVIA C.L.**, ROCA M. A; TOBIN M.; RINAUDO A.; GUIBERT E. E. (2019) **“VARIACIÓN ESTACIONAL DE LA PREVALENCIA DE ENDOMETRITIS Y CONDICIÓN CORPORAL EN VACAS LECHERAS DE LA CUENCA SANTAFESINA”**. En libro de Resúmenes: XX Jornadas de Divulgación Técnico - Científicas 2019 Facultad de Ciencias Veterinarias - UNR. ISBN 978-987-46406-8-0. Pág. 450-451. Casilda (Argentina).

-**SAVIA C. L.**, MEURZET C.G.; OSORIO J; RODRIGUEZ J.V.; RINAUDO A; GUIBERT E. E. (2019) “**DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE SÓLIDOS TOTALES EN MOCO CERVICAL BOVINO A PARTIR DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN**”. En libro de Resúmenes: XIII Jornada de Ciencia y Tecnología 2019. Universidad Nacional de Rosario, Secretaría de Ciencia y Tecnología. ISBN 978-987-702-379-4. Pág. 156. Rosario (Argentina).

- **SAVIA C.L.**, ROCA M.A; GONZALES L.V; RODRIGUEZ J.V; GUIBERT E.E; RINAUDO A. (2018) “**ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL MOCO CERVICAL DE VACAS LECHERAS CON ENDOMETRITIS CLÍNICA Y SUBCLÍNICA**”. En libro de Resúmenes: XII Jornada de Ciencia y Tecnología 2018. Universidad Nacional de Rosario, Secretaría de Ciencia y Tecnología. ISBN 978-987-702-366-4. Pág. Rosario (Argentina).

-**SAVIA C.L.**; ROCA M.A; GONZALES L.V; RODRIGUEZ J.V; GUIBERT E.E; RINAUDO A. (2018) “**ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DEL MOCO CERVICAL EN VACAS LECHERAS CON ENDOMETRITIS CLÍNICA Y SUBCLÍNICA**”. En libro de Resúmenes: XIX Jornadas de Divulgación Técnico - Científicas 2018 Facultad de Ciencias Veterinarias - UNR. ISBN: 978-987-46406-5-9. Pág. 371-372. Casilda (Argentina).

ÍNDICE DE CONTENIDOS

PRESENTACIONES PARCIALES DE LA TESIS	IV
Artículos en Revistas	IV
Comunicaciones en Jornadas y Congresos.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS	XII
ÍNDICE DE FIGURAS	XIV
ÍNDICE DE GRÁFICOS	XVII
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	XIX
1 RESUMEN	1
2 INTRODUCCIÓN	5
3 OBJETIVOS e HIPÓTESIS	9
3.1 Objetivo general	9
3.2 Objetivos específicos	9
3.3 Hipótesis	9
4 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
4.1 Aparato reproductor de la hembra bovina.....	10
4.2 Ciclo estral	15
4.3 Moco cérvico-vaginal	19
4.3.1 Composición del moco cérvico-vaginal.....	19
4.4 Enfermedades del aparato reproductor en el postparto	26
4.5 Problemas asociados a endometritis	29
4.6 Técnicas diagnósticas de endometritis	31
5. MATERIALES Y MÉTODOS	35
5.1 Animales y localización geográfica	35
5.2 Examen de los animales	36
5.2.1 Condición corporal	37
5.2.2 Temperatura corporal	37

5.2.3 Aparato reproductor	37
5.2.3.1 Fase del ciclo.....	37
5.3 Criterios de clasificación de Grupos Experimentales	39
5.3.1 Técnica de <i>Cytobrush</i>	39
5.3.1.1 Tinción de muestras endometriales	40
5.3.1.2 Lectura de las muestras endometriales	43
5.3.2 Moco cérvico-vaginal	44
5.3.2.1 Recolección del MCV.....	44
5.3.2.2 Clasificación del MCV	44
5.3.3 Grupos experimentales.....	46
5.4 Ensayos realizados en muestras sin solubilizar	48
5.4.1 Evaluación del MCV.....	48
5.4.2 Determinación de pH	50
5.4.3 Utilización de Tiras reactivas	51
5.5 Desarrollo de un protocolo de homogeneización para muestras de MCV.	53
5.5.1. Determinación de la concentración mínima de Triton X-100 [®] que homogeneiza las muestras MCV y no deja residuos después de la deseccación completa	53
5.5.2 Efecto de la adición de Triton X-100 [®] sobre las propiedades físicoquímicas del mucus	54
5.5.2.1 Efecto de la adición de Triton X-100 [®] sobre el índice de refracción.....	55
5.5.2.2 Efecto de la adición de Triton X-100 [®] sobre la concentración de sólidos totales.....	56
5.5.2.3 Efecto de la adición de Triton X-100 [®] sobre la concentración de proteínas totales.....	56

5.5.2.4 Efecto de la adición de Triton X-100 [®] sobre la concentración de iones.....	57
5.6 Ensayos realizados en muestras homogeneizadas	58
5.6.1 Determinación de sólidos totales	58
5.6.1.1 Determinación de sólidos totales a partir del índice de refracción de las muestras.....	58
5.6.1.2 Determinación de cTS en los grupos con endometritis.....	59
5.6.2 Determinación del porcentaje de agua	59
5.6.3 Determinación de la refractividad.....	60
5.6.4 Determinación de proteínas totales	60
5.6.4.1 Determinación de proteínas totales a partir del índice de refracción de las muestras.....	60
5.6.5 Determinación de iones	61
5.7 Análisis estadísticos.....	61
5.7.1 Técnicas estadísticas aplicadas en los resultados de los ensayos en muestras sin solubilizar.....	62
5.7.2 Técnicas estadísticas aplicadas en el análisis del desarrollo del protocolo de homogeneización del mucus.....	62
5.7.3 Técnicas estadísticas aplicadas en el análisis de muestras solubilizadas.....	62
5.7.4 Análisis multivariado	63
6 RESULTADOS	64
6.1 Prevalencia de endometritis.....	64
6.1.1 Variación estacional de la prevalencia.....	65
6.1.2 Variación estacional de la condición corporal.....	67
6.2 Ensayos realizados en muestras sin solubilizar	68
6.2.1 Evaluación del MCV.....	68

6.2.1.1 Tipo de MCV y relación con el estatus sanitario uterino	68
6.2.1.2 Evaluación del MCV al microscopio óptico.....	68
6.2.1.2.1 Lectura de fondo de extendido y tipo de flujo en grupos experimentales.....	68
6.2.1.2.2 Evaluación de la lectura según tipo de flujo 0.....	73
6.2.1.2.3 Análisis de la técnica de lectura de fondo de extendido para el diagnóstico de ES y EC.....	74
6.2.1.2.4 Relación entre el fondo del extendido de MCV y porcentaje de polimorfonucleares neutrófilos en <i>cytobrush</i>	75
6.2.2 Determinación de pH	76
6.2.3 Utilización de Tiras reactivas	78
6.2.3.1 Comparación entre los resultados de pH medido por las tiras reactivas de referencia y las tiras reactivas de orina.....	78
6.2.3.2 Comparación entre los resultados de proteínas determinados por el método de Ácido Bicinconínico y las tiras reactivas de orina.....	78
6.2.3.3 Glucosa, cuerpos cetónicos, urobilinógeno.....	78
6.2.3.4 Prueba de Esterasa Leucocitaria.....	79
6.3 Desarrollo de un protocolo de homogeneización para muestras de MCV	81
6.3.1 Concentración mínima de Triton X-100 [®] que homogeneiza las muestras MCV y no deja residuos después de la desecación completa ...	81
6.3.2 Efecto de la adición de Tritón X-100 [®] sobre las propiedades fisicoquímicas del mucus	82
6.3.2.1 Efecto de la adición de Tritón X-100 [®] sobre el índice de refracción.....	82

6.3.2.2 Efecto de la adición de Tritón X-100 [®] sobre la concentración de sólidos totales, proteínas totales e iones.....	82
6.4 Ensayos realizados en muestras homogeneizadas	83
6.4.1 Determinación de sólidos totales	83
6.4.1.1 Determinación de sólidos totales a partir del índice de refracción de las muestras	84
6.4.1.2 Determinación de cTS en los grupos con endometritis	85
6.4.2 Determinación del porcentaje de agua	87
6.4.3 Determinación de la refractividad.....	88
6.4.4 Determinación de proteínas en MCV	89
6.4.4.1 Determinación de proteínas totales a partir del índice de refracción de las muestras	91
6.4.5 Determinación de iones	92
6.4.5.1 Determinación de Na ⁺	93
6.4.5.2 Determinación de K ⁺	93
6.4.5.3 Relación Na ⁺ /K ⁺ según estatus sanitario uterino.....	94
6.4.5.4 Determinación de Mg ²⁺	95
6.5 Análisis multivariado de los datos	95
6.5.1 Matriz de correlación.....	95
6.5.2 Análisis de componentes principales.....	97
6.5.2.1 Correlación de las componentes principales con las variables en estudio.....	99
6.5.3 Árboles de clasificación.....	105
7 DISCUSIÓN	107
8 CONCLUSIONES	120
9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fases del ciclo estral en la hembra bovina	18
Tabla 2. Prevalencia de endometritis subclínica según autor, momento de muestreo y punto de corte utilizado. Adaptado de Quintela y col., 2017.....	34
Tabla 3. Prevalencia de vacas con estatus sanitario uterino sano, endometritis subclínica y endometritis clínica, en Santa Fe, Argentina. Periodo 2017-2021..	64
Tabla 4. Prevalencia de vacas con estatus sanitario uterino sano, endometritis subclínica y clínica, según semana de muestreo, en Santa Fe, Argentina. Periodo 2017-2021	65
Tabla 5. Relación entre el tipo de moco obtenido y el fondo de extendido	70
Tabla 6. Lectura de extendidos de flujo tipo 0 en muestras de MCV transparentes y turbias.....	73
Tabla 7. Análisis de Se, Esp, VVP, VPN, LR para la prueba de lectura de fondo de extendido como técnica diagnóstica en hembras con ES y EC.....	74
Tabla 8. Determinación de pH en MCV de grupos experimentales	76
Tabla 9. Determinación de pH en muestras de MCV en fase folicular de vacas con estatus sanitario uterino sano, con endometritis subclínica y con endometritis clínica.....	77
Tabla 10. Análisis de Se, Esp, VVP, VPN, LR para la prueba de esterasa leucocitaria como técnica diagnóstica en hembras con ES y EC.....	80
Tabla 11. Selección de la concentración óptima de Triton X-100® para el protocolo de solubilización de muestras de MCV.....	81
Tabla 12. Efecto de la adición de Triton X-100® 0.01% (V/V) en muestras de moco cérvico-vaginal.....	82

Tabla 13. Concentración de sólidos totales (g/dL) en muestras de MCV en fase folicular y lútea de los grupos con estatus sanitario uterino sano, endometritis subclínica y endometritis clínica.....	84
Tabla 14. Porcentaje de agua en muestras de MCV de los grupos experimentales.....	87
Tabla 15. Valores de refractividad de muestras de MCV de los grupos experimentales.....	88
Tabla 16. Proteínas totales en muestras de MCV de hembras con estatus sanitario uterino sano, endometritis subclínica y endometritis clínica.	90
Tabla 17. Determinación de potasio en muestras de MCV de los grupos experimentales.....	93
Tabla 18. Determinación de magnesio en muestras de MCV de los grupos experimentales.....	95
Tabla 19. Matriz de correlación entre las variables cuantitativas en estudio. ..	96
Tabla 20. Análisis de componentes principales	98
Tabla 21. Variables más correlacionadas con CP1	99
Tabla 22. Variables más correlacionadas con CP2.	100
Tabla 23. Variables más correlacionadas con CP3	100

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imagen representativa del aparato reproductor de la hembra bovina.....	10
Figura 2. Microfotografía, corte histológico de útero. Endometrio (a), miometrio (b), perimetrio (c), carúnculas (d) y glándulas (e).....	14
Figura 3. Imagen representativa de las cuencas lecheras de Argentina, en la cual se puede observar las cuencas Sur (1) y Centro (2) de la provincia de Santa Fe.....	36
Figura 4. Esquema de clasificación de animales a incluir en el muestreo.....	38
Figura 5. Elementos utilizados para toma de muestra de citología endometrial. Cepillo endocervical Medibrush® XL presentación comercial y cepillo cortado a 5 cm de largo (a). Pistola de inseminación modificada en su punta, vaina plástica y cepillo cortado (b).....	40
Figura 6. Extendido de <i>cytobrush</i> a campo.	40
Figura 7. Microfotografía óptica de extendido endometrial. Magnificación: 400X, Tinción 15®, Biopur, Argentina.	42
Figura 8. Imagen esquemática de la técnica de lectura del preparado en guarda griega	43
Figura 9. Moco cérvico-vaginal normal y purulento. flujo tipo 0 (a) y (b), flujo purulento 1 (c)	45

Figura 10. Moco cérvico-vaginal purulento.....	46
Figura 11. Fotos representativas de citología endometrial en los grupos control (a), endometritis subclínica (b) y endometritis clínica (c). Microfotografía óptica 400X, Tinción 15 [®] , Biopur, Argentina	47
Figura 12. Cristalización de moco cérvico-vaginal. Mucus desecado con precipitación de estructuras cristalinas (a) y microfotografía 400X de cristalización del MCV (b).....	49
Figura 13. Esquema representativo de recolección y lectura de extendidos de MCV bovino.....	50
Figura 14. Elementos utilizados para la determinación de pH. Tira reactiva de pH rango 0-14 (PHI-14 TEST PAPER [®]) con escala otorgada por el fabricante (a). Materiales utilizados para la lectura de pH (b).....	51
Figura 15. Tiras reactivas Urine Strip Wiener lab [®] . Prueba esterasa leucocitaria negativa (a). Diferentes escalas de lectura positiva de esterasa leucocitaria en muestras de MCV (b)	52
Figura 16. Equipos utilizados para la determinación de sólidos totales. Muestras de moco cérvico-vaginal en canastas papel aluminio, en horno de secado de aire forzado horizontal (a). Pesaje de las muestras en balanza analítica (b).....	54
Figura 17. Refractómetro de mano ALLA FRANCE [™] (a). Escala refractómetro de mano (b). Refractómetro digital ATAGO [™] PAL-RI (c).	56

Figura 18. Lector de placas TECAN F50™ utilizado para la determinación de proteínas totales (a). Fotómetro de llama Zentec ZF™ 2500, utilizado para la determinación de sodio y potasio (b).....57

Figura 19. Imagen de extendido de MCV. Extendido de gota de moco con fondo limpio (a) 100X. Extendido con fondo sucio (c) 100X. Tinción con H-E con fondo limpio (b) y de extendido con fondo sucio (d), Magnificación: 400X.....71

Figura 20. Imagen de extendido de MCV con tinción H-E. Lectura fondo limpio (a) 100X. Extendido con fondo sucio (c) 100X. Extendido con fondo limpio (b), en el cual se observan a 400X estructuras que conforman los cristales teñidos con coloración basófila y eosinófila. Extendido de fondo sucio (d) 400X, en el cual se visualizan células, PMN N y detritus. 72

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Distribución según estación del año del estatus sanitario uterino de vacas lecheras Holando Argentino, en establecimientos de la provincia de Santa Fe, Argentina. Periodo 2017-2021	66
Gráfico 2. Condición corporal de vacas lecheras Holando Argentino en el periodo postparto según estación del año, provincia de Santa Fe, Argentina. Periodo 2017-2021	67
Gráfico 3. Relación entre la lectura del fondo de extendido de MCV y el porcentaje de polimorfonucleares neutrófilos en <i>cytobrush</i>	75
Gráfico 4. Valores de pH de muestras de MCV de grupos experimentales	77
Gráfico 5. Relación entre actividad esterasa leucocitaria en muestras de MCV y porcentaje de polimorfonucleares neutrófilos en <i>cytobrush</i>	80
Gráfico 6. Regresión lineal entre sólidos totales gravimétricos (gTs) (g/dL) y valores de refractividad de muestras de MCV del grupo control	85
Gráfico 7. Correlación entre los valores de sólidos totales gravimétricos (gTS) (g/dL) y sólidos totales calculados (cTS) (g/dL) de muestras de MCV del grupo endometritis subclínica.....	86
Gráfico 8. Correlación entre los valores de sólidos totales gravimétricos (gTS) (g/dL) y sólidos totales calculados (cTS) (g/dL) de muestras de MCV del grupo endometritis clínica.....	86
Gráfico 9. Concentración de proteínas totales (g/dL) en muestras de MCV de grupos con estatus sanitario uterino sano, endometritis subclínica y endometritis clínica.....	90
Gráfico 10. Regresión lineal entre concentración de albúmina (g/dL) y valores de refractividad de muestras de MCV	91

Gráfico 11. Concentración de proteínas totales (g/dL) en muestras de MCV determinada mediante la técnica del Ácido Bicinónico y mediante el valor del índice de refracción	92
Gráfico 12. Relación Na^+/K^+ según estatus sanitario uterino	94
Gráfico 13. Mapa de calor. Nivel de correlación bivariada de Pearson de las variables estudiadas.....	97
Gráfico 14. Porcentaje de varianza que representa cada dimensión o componente en estudio	98
Gráfico 15. Gráfico Biplot: CP1 vs CP2 según variable fondo de extendido..	101
Gráfico 16. Gráfico Biplot: CP1 vs CP3 según variable fondo de extendido..	102
Gráfico 17. Gráfico Biplot: CP1 vs CP2 según estatus sanitario uterino.....	103
Gráfico 18. Gráfico Biplot: CP1 vs CP3 según estatus sanitario uterino.....	104
Gráfico 19. Árbol de clasificación para determinar el estatus sanitario uterino de la vaca a partir del análisis de muestras de MCV y CB.....	106

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

- ALP:** Fosfatasa alcalina
- BEN:** Balance energético negativo
- C.T:** Células totales
- CB:** *Cytobrush*
- CC:** Condición corporal
- CP:** Componentes principales
- cPT:** Proteínas totales calculadas
- cTS:** Sólidos totales calculados
- DEL:** Días en leche
- EC:** Endometritis clínica
- ES:** Endometritis subclínica
- Esp:** Especificidad
- Est:** Estándar
- FE:** Fondo de extendido
- FF:** Fase folicular
- FL:** Fase lútea
- FSH:** Hormona Folículo Estimulante
- GNRH:** Hormona Estimulante de Gonadotrofinas
- gTs:** Sólidos totales gravimétricos
- H-E:** Hematoxilina-Eosina
- IgA:** Inmunoglobulina A
- IL:** Interleuquina
- IR:** Índice de refracción
- L:** Limpio
- LDH:** Lactato deshidrogenasa
- LE:** Esterasa Leucocitaria
- LH:** Hormona Luteinizante
- LK:** Likelihood ratio o razón de verosimilitud
- Malt:** Tejido linfoide asociado a la mucosa
- MCV:** Moco cérvico-vaginal
- MS:** Materia seca
- NEFA:** Ácidos grasos no esterificados

PMN N: Polimorfonucleares neutrófilos

PT: Proteínas totales

PTBCA: Proteínas totales determinadas por el método de Ácido Bicinconínico

P4: Progesterona

R: Refractividad

S: Sano

DE: Desvio estándar

Se: Sensibilidad

ST: Sólidos totales

Su: Sucio

T: Turbio

Tr: Transparente

VPN: Valor predictivo negativo

VPP: Valor predictivo positivo

X²: Chi Cuadrado

% H₂O: Porcentaje de agua

% PMN N: Porcentaje de Polimorfonucleares neutrófilos

TM: Marca de comercio - Trade Mark

®: Marca registrada

1 RESUMEN

Título: CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL MOCO CÉRVICO-VAGINAL DE VACAS LECHERAS HOLANDO ARGENTINO CON ENDOMETRITIS SUBCLÍNICA

Palabras claves: endometritis subclínica, producción lechera, moco cérvico-vaginal, flujo, características físico-químicas, reproducción.

En la actualidad, existe mucha presión de selección sobre los caracteres del macho para la elección de reproductores, pero no se tiene en cuenta las características del ambiente uterino de la hembra. La reproducción es un pilar fundamental en la producción de leche, ya que para lograr la mayor eficiencia del sistema es necesario que las vacas se preñen y tengan pariciones a intervalos regulares. Las enfermedades uterinas, principalmente infecciones inespecíficas, son la causa más común de infertilidad y contribuyen en forma significativa a las pérdidas económicas de la industria lechera. La endometritis es la inflamación de la mucosa uterina, que en ausencia de signos clínicos se denomina endometritis subclínica (ES). La principal característica de esta entidad es la presencia de neutrófilos en el útero. En bovinos el diagnóstico se realiza mediante el estudio de la citología, utilizando la técnica de *cytobrush*, la cual requiere tiempo y experiencia por parte del operador, por esta razón no es una técnica práctica para realizar a campo. El moco cérvico-vaginal (MCV) aporta información sobre la condición del tracto reproductor de la hembra, por lo cual tiene un gran potencial como fuente de biomarcadores de patologías del sistema reproductor en mujeres y animales. Además, puede recolectarse de forma fácil y rápida, sin ocasionar daños en la mucosa uterina y no requiere de capacitación especial. El objetivo de esta tesis fue evaluar las características físico-químicas del moco cérvico-vaginal de vacas lecheras Holando Argentino con y sin endometritis subclínica. Se analizaron 450 vacas Holando Argentino pertenecientes a establecimientos de la cuenca lechera de Santa Fe,

Argentina, las cuales se clasificaron en tres grupos según tipo de flujo y lectura de cytobrush: sano, endometritis subclínica y endometritis clínica. Las variables analizadas en el moco fueron: pH, tipo de flujo, características macroscópicas y microscópicas, actividad de enzima esterasa leucocitaria (LE), concentración de sólidos totales, proteínas e iones (Na^+ , K^+ , Mg^{2+}), índice de refracción y porcentaje de agua. Además, se evaluó la prevalencia de la enfermedad. Como resultado se obtuvo que la prevalencia de ES en la cuenca lechera de Santa Fe fue del 35%. Se encontraron diferencias significativas entre el comportamiento de las entidades y las estaciones del año, siendo la primavera la estación con menor porcentaje de endometritis. En cuanto al análisis macroscópico del flujo, no se encontró una relación significativa entre el aspecto turbio y la ES. Se encontraron diferencias entre el tipo de fondo de extendidos de MCV y el estatus uterino ($p < 0.0001$), así como entre el porcentaje de neutrófilos en *cytobrush* en muestras de fondo limpio y sucio ($p < 0.0001$). El estudio del fondo como técnica diagnóstica arrojó un 58% de sensibilidad y 85% de especificidad. El 86% de las muestras de MCV resultaron positiva la prueba de LE, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la lectura de LE entre el grupo S y ES ($p < 0.0001$). La prueba de esterasa leucocitaria reveló 86% de sensibilidad y 95% de especificidad para el diagnóstico de ES. En cuanto al pH se obtuvo diferencias entre los grupos ($p = 0.0026$), siendo más alcalino en MCV de hembras que presentaron ES. No se encontraron diferencias entre los grupos en la concentración de sólidos totales, proteínas totales, Mg^{2+} , Na^+ , porcentaje de agua y valores de refractividad ($p > 0.05$). Se encontraron diferencias significativas en la concentración de K^+ (meq/L) entre los grupos ($p = 0.01$), así como en la relación Na^+/K^+ ($p = 0.003$). En conclusión, no se encontró asociación entre el tipo de flujo y ES. Se encontró asociación entre el porcentaje de neutrófilos en *cytobrush* y el tipo de fondo de extendido de MCV. Las características físico-químicas que se modificaron en MCV de vacas con ES fueron: pH, concentración de K^+ y actividad LE. La concentración de sólidos totales, proteínas totales, Mg^{2+} , Na^+ , porcentaje de agua y valores de refractividad no se modificaron. La prueba de esterasa leucocitaria reveló alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de endometritis subclínica en muestras de mucus.

Abstract

Title: Physical-chemical characteristics of cervico-vaginal mucus from Holando Argentino dairy cows with subclinical endometritis

Keywords: subclinical endometritis, dairy production, cervico-vaginal mucus, discharge, physicochemical characteristics, reproduction.

Nowadays, for the choice of reproducers the selection pressure is focused mainly on bulls characteristics, however, little attention is taken to the uterine environment of female cows. In milk production the reproduction is a fundamental pillar, since in order to achieve the highest efficiency of the system it is necessary for the cows to conceive and calve at regular intervals. Uterine diseases, mainly non-specific infections, are the most common cause of infertility and produce significant economic losses to the dairy industry. Endometritis is a mucosa uterine inflammation, which in the absence of clinical signs is defined as subclinical endometritis (ES). The main characteristic of this entity is the presence of neutrophils in the uterus and in cows subclinical endometritis can be detected by cytology using the cytobrush technique. Cytobrush is an operator dependent technique which requires time and technical skills, for this reason it is not a routine practice in a farm. Cervico-vaginal mucus (CVM) provides valuable information about the health condition of the female reproductive tract, therefore, it has great potential as a source of biomarkers for pathologies of the reproductive system in women and animals. Furthermore, it is collected easily and quickly, without causing damage to the uterine mucosa and without special training. The goal of this thesis was to evaluate the physicochemical characteristics of cervico-vaginal mucus of Holando Argentino dairy cows with and without subclinical endometritis. The study population consisted of 450 Holando Argentino cows from farms located in the dairy basin of Santa Fe, Argentina. Cows were classified into three experimental groups according to discharge type and cytobrush reading: healthy, subclinical endometritis, and clinical endometritis. The

variables analysed in the mucus were: pH, discharge type, macroscopic and microscopic characteristics, leukocyte esterase enzyme activity (LE), total solids concentration, proteins and ions (Na^+ , K^+ , Mg^{2+}), refractive index and water percentage. Furthermore, the prevalence of the disease was evaluated. As a result, it was obtained that the prevalence of ES in the dairy basin of Santa Fe was 35%. Significant differences were found between the behaviour of the entities and the seasons of the year, being spring the season with the lowest percentage of endometritis. Regarding the macroscopic analysis of the mucus, no significant relationship was found between the cloudy aspect and the entity. Differences were found between the type of background of MCV spreads and uterine status ($p < 0.0001$), as well as between the percentage of neutrophils in cytobrush in samples with a clean and dirty background ($p < 0.0001$). The background study as a diagnostic technique yielded 58% sensitivity and 85% specificity. 86% of the MCV samples were positive for the LE test, statistically significant differences were found in the LE reading between the S and ES groups ($p < 0.0001$). The leukocyte esterase test revealed 86% sensitivity and 95% specificity for the diagnosis of ES. Regarding the pH, differences were obtained between the groups ($p = 0.0026$), being more alkaline in MCV of females that had ES. No differences were found between the groups in the total solids concentration, total proteins concentration, Mg^{2+} , Na^+ , water percentage and refractivity values ($p > 0.05$). Differences were found in the K^+ concentration between the groups ($p = 0.01$), as well as in the Na^+/K^+ relationship ($p = 0.003$). In conclusion, no association was found between discharge type and ES. An association was found between the percentage of neutrophils in cytobrush and the type of MCV spread background. The physicochemical characteristics that were modified in ES cow MCV were: pH, K^+ concentration and LE activity. The total solids concentration, total proteins concentration, Mg^{2+} , Na^+ , water percentage, and refractivity values did not change. The leukocyte esterase test that revealed high sensitivity and specificity for the diagnosis of subclinical endometritis in mucus samples.

2 INTRODUCCIÓN

Los sistemas de producción lechera persiguen como uno de sus principales objetivos lograr la máxima rentabilidad productiva y por ende económica, del rodeo en general y de sus vacas en particular. Para alcanzar este objetivo es necesario articular factores genéticos, nutricionales, sanitarios y de manejo. La reproducción es un pilar clave de la producción de leche (LeBlanc, 2008), ya que tiene un gran impacto en el éxito de la economía de cualquier unidad lechera (Gilbert, 2016). Para que el sistema sea eficiente se necesita que las hembras bovinas se preñen rápidamente postparto y puedan parir a intervalos regulares, que permitan incrementar la producción individual y total del rodeo (Palmer, 2008). Esto se debe a que cuanto más frecuentemente una vaca lechera tenga un ternero, mayor será la cantidad de leche producida durante su vida. Cualquier problema reproductivo que interfiera con el objetivo de obtener un ternero por año es de suma importancia (Rinaudo y col., 2017). La baja eficiencia reproductiva tiene como resultado sobre los sistemas de producción lechera importantes pérdidas económicas por menor producción y menor número de nacimientos de terneros por año (Marini y col., 2002). Además, el control de las enfermedades reproductivas es un punto clave para el mantenimiento de la salud y bienestar de las vacas, así como para reducir los antibióticos aplicados a los animales, lo que le permite a la empresa lechera garantizar un producto saludable, seguro y nutritivo (Gilbert, 2016).

El mejoramiento genético y el incremento en la producción de leche bovina en las últimas décadas fueron acompañados por el aumento de problemas sanitarios y como consecuencia de ello se han incrementado los costos. Problemas en la fertilidad, descarte de animales, baja producción sumado a costos directos por tratamientos, se traducen en grandes pérdidas para el productor en particular y la industria lechera en general.

La mayoría de los desórdenes importantes del periodo postparto son atribuibles a alteraciones metabólicas e inmunológicas que ocurren en el periodo de transición (Gilbert, 2016), debido a los cambios en el consumo de materia seca, movilización de nutrientes y demanda de producción láctea que el animal afronta.

Los efectos combinados del inicio de la lactancia y los eventos fisiológicos del parto, resultan en deficiencias transitorias de vitaminas y minerales, así como en cambios en la función inmunitaria (Gilbert, 2016). Estas alteraciones se traducen en trastornos uterinos posparto como: retención de membranas fetales, metritis, endometritis y patologías ováricas (Gilbert, 2016).

Las infecciones uterinas no tratadas obligan al productor a descartar vacas que de otra manera podrían ser fuente de producción de leche y vaquillonas de reposición. La inflamación uterina es una enfermedad reproductiva que produce una significativa reducción de la fertilidad y por ende una disminución de la eficiencia biológica de la vaca lechera. Es importante destacar el lugar que ocupa el control sanitario en el manejo posparto como medida preventiva de las infecciones uterinas, como también el bienestar general de la vaca lechera (nutrición, sanidad, manejo, alimentación).

En las últimas etapas del parto e inmediatamente después de producido el mismo, ocurre una invasión principalmente ascendente, de microorganismos provenientes del cérvix, la vagina, el vestíbulo y la región perineal. El 90% de las vacas adquieren infección uterina durante las dos primeras semanas posparto (Rinaudo y col., 2012). El período posparto es un momento extremadamente importante en la vida reproductiva de la vaca debido a su gran influencia sobre la eficiencia reproductiva futura de la hembra. Las enfermedades uterinas posparto, principalmente infecciones inespecíficas, son la causa más común de infertilidad en vacas y contribuyen en forma significativa a las pérdidas económicas de la industria bovina, ya que las mismas retrasan la involución posparto del útero, prolongan el tiempo necesario para el reinicio de la actividad ovárica cíclica, aumentan el número de servicios por concepción y consecuentemente prolongan el intervalo entre partos.

Los patógenos frecuentemente asociados a infecciones uterinas son: *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes*, *Fusobacterium necrophorum* y *Prevotella spp.*, (Sheldon y col., 2008; Wagener y col., 2017). Además, pueden encontrarse otros microorganismos como: *Pseudomona spp.*, *Clostridium perfringens*, *Bacteroides melaninogenicus*, *Streptococcus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Staphilococcus epidermidis*, *Herpesvirus bovino tipo 4* y *Micrococcus spp.*, (LeBlanc y col., 2002;

Kasimanickam y col., 2004; Sheldon y col., 2008; Sheldon y col., 2009; Rinaudo, 2012; Madoz y col., 2013; Wagener y col., 2017). La mayor parte de estas infecciones son resueltas en general por los mecanismos de defensa del útero (Sheldon y col., 2008). Los polimorfonucleares neutrófilos (PMN N) son las principales células efectoras del sistema inmune para eliminar las bacterias del útero luego del parto, además actúan como primera línea de defensa, ya que son las primeras en llegar al sitio de inflamación (Sheldon y col., 2009). Las bacterias patógenas con frecuencia resisten a los mecanismos de defensa del organismo, causando la inflamación del útero, una de las principales causas de la infertilidad (Sheldon y col., 2006). El desarrollo de la enfermedad clínica depende del equilibrio entre la patogenicidad de los microorganismos y la capacidad de la respuesta inmune del huésped (Sheldon y col., 2009). Pudiendo el desequilibrio culminar en patologías como la metritis puerperal, piómetra, endometritis clínica y endometritis subclínica (Földi y col., 2006). Todos los procesos inflamatorios del útero afectan al endometrio y pueden o no extenderse al miometrio y perimetrio. Así, la endometritis es la inflamación del endometrio usualmente debida a la persistencia de una infección moderada o al retraso en la involución uterina (Palmer, 2008). La endometritis subclínica (ES) es la inflamación del endometrio en ausencia de signos clínicos (Sheldon y col., 2006), cuya característica principal es la presencia de polimorfonucleares neutrófilos en el endometrio (Sheldon y col., 2009). Las hembras con endometritis subclínica no presentan descargas de tipo purulenta, por lo cual se requiere un método de diagnóstico que permita determinar la posibilidad de inflamación en el útero (Sheldon y col., 2006). La citología se postula como la técnica más confiable y precisa para el diagnóstico de ES (Barlund y col., 2008). Las células pueden recolectarse mediante la técnica de lavaje uterino o por cytobrush (Kasimanickam y col., 2005). El inconveniente es que, si bien el cytobrush es un método más pragmático y rápido de realizar que el lavado uterino, no es práctico de implementar en condiciones a campo (LeBlanc, 2008), ya que se necesita realizar una serie de pasos para arribar al diagnóstico: toma de muestra, fijación del preparado, tinción, observación y conteo de células inflamatorias. Por este motivo es una maniobra que no se implementa en forma rutinaria en el control reproductivo de rodeos comerciales. Por ello se requieren técnicas que permitan el diagnóstico

rápido al lado de la vaca, ya que se facilitaría la toma de la muestra, la cuantificación de la prevalencia y la evaluación del tratamiento (Palmer, 2008).

El moco cérvico-vaginal (MCV) o flujo puede recolectarse de forma fácil y rápida, no ocasiona daños inflamatorios en la mucosa uterina y no requiere de capacitación especial para la toma de muestra, por lo cual es un recurso más accesible para evaluar el estado del tracto reproductivo de hembra. El mucus aporta información sobre la condición del tracto reproductor, por lo cual tiene un gran potencial como fuente de biomarcadores para patologías del aparato genital femenino (Zegels, y col., 2010; Van Raemdonck y col., 2014; Adnane y col., 2018a) en mujeres y animales. Se compone de una mezcla de secreciones uterinas, cervicales y vaginales (Adnane y col., 2018a) y es producido continuamente por células secretoras del endocérvix y del epitelio vaginal anterior. Esta secreción protege el aparato reproductor bovino manteniendo húmedas las superficies epiteliales y lubricado e interviene en el proceso de fertilización (Cortés y col., 2016; Adnane y col., 2018b). La cantidad y composición del MCV varía según el estado del ciclo estral de la hembra bovina (Schumacher, 1970; Cortés y col., 2016). En presencia de elevada concentración de estrógenos se produce una gran cantidad de moco fluido, que cercano al momento del estro se vuelve transparente y líquido (Tsiligianni y col., 2000). La materia seca y viscosidad alcanzan valores mínimos, mientras que la elasticidad de flujo alcanza un punto máximo (Cortés y col., 2016). En la fase lútea el moco disminuye la fluidez, así como la cantidad producida y se torna opaco (Tsiligianni y col., 2001a; Cortés y col., 2016). Los valores de cristalización y pH también se modifican de acuerdo al ciclo estral de la hembra (Tsiligianni y col., 2001a). Según estudios previos, se detectaron valores altos de cristalización y pH, en MCV recolectado al momento de la inseminación artificial, en hembras que resultaron vacías post servicio (Bernardi y col., 2018), así como cambios en el contenido iónico, resultando mayor concentración de K^+ y Mg^{2+} en hembras no preñadas (Savia y col., 2018). Además, en lavados uterinos de vacas con ES se reportaron niveles mayores de citoquinas inflamatorias y proteínas de fase aguda como Haptoglobina y Amiloide A sérico (Brodzki y col., 2015). Por lo cual las modificaciones de las características del MCV podrían aportar información del estado de las hembras que cursen con endometritis subclínica.

3 OBJETIVOS e HIPÓTESIS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar las características físico-químicas del moco cérvico-vaginal de vacas lecheras Holando Argentino con y sin endometritis subclínica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar las siguientes propiedades del moco cérvico-vaginal de vacas con y sin endometritis subclínica:

- 1) Tipo y características de flujo
- 2) pH
- 3) Evaluación al microscopio óptico de extendido de MCV
- 4) Actividad de enzima esterasa leucocitaria
- 5) Concentración de sólidos totales y porcentaje de agua
- 6) Índice de refracción
- 7) Concentración de proteínas totales
- 8) Concentración de iones (Na^+ , K^+ , Mg^{2+})

3.3 HIPÓTESIS

Las propiedades físico-químicas del moco cérvico-vaginal se modifican en vacas que presentan endometritis subclínica.

4 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 APARATO REPRODUCTOR DE LA HEMBRA BOVINA

El sistema reproductor de la hembra cumple múltiples funciones; es el encargado de producir y nutrir las gametas, brindar un ambiente adecuado para el desarrollo de las mismas, transportarlas hasta su encuentro con el espermatozoide, llevar a cabo la fecundación, implantación y desarrollo del embrión, formar la placenta, mantener la gestación y producir el parto. Por lo cual es el sistema encargado de la perpetuación de la especie.

El aparato reproductor de la hembra se encuentra conformado por órganos intrínsecos (Figura 1); ovario, oviducto, útero, vagina, vulva, y órganos extrínsecos; hipófisis, hipotálamo, glándula mamaria y glándula pineal, que en conjunto actúan para llevar a cabo las funciones reproductivas anteriormente mencionadas.

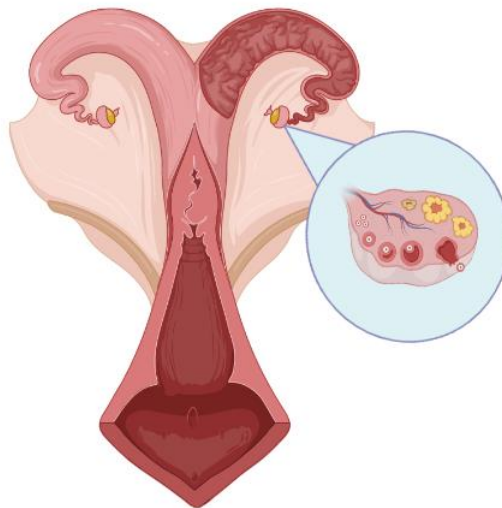


Figura 1. Imagen representativa del aparato reproductor de la hembra bovina. Se observan los ovarios, trompas uterinas, cuernos bilaterales (con una apertura del cuerno, en el cual se puede identificar la mucosa) cuerpo uterino, cérvix, vagina y vestíbulo vaginal. El ovario (imagen con zoom) presenta esquemas de folículos en diferentes grados de desarrollo, así como cuerpos amarillos o lúteos. En la imagen puede observarse los cambios que ocurren en las estructuras ováricas durante el ciclo estral. “Creado con BioRender.com”.

El ovario es un órgano par, ovoide y se encuentra ubicado en la entrada de la pelvis. Es una glándula de tipo mixta, ya que tiene secreción endócrina y exócrina. La función endócrina es sintetizar hormonas sexuales y la función exócrina es producir ovocitos (Gázquez Ortiz, 2004). Histológicamente se encuentra recubierto por un epitelio cúbico bajo, que se contacta con tejido conectivo denso denominado túnica albugínea (Ross & Pawlina, 2016). El parénquima se encuentra compuesto por la corteza y la médula. La corteza es la porción externa en donde se alojan los folículos primordiales y folículos en diferentes grados de desarrollo, tejido conectivo y cuerpos amarillos o lúteos. La región medular es central y posee las estructuras que le aportan la nutrición al ovario, se compone de tejido conectivo laxo, nervios, vasos sanguíneos y linfáticos (Gázquez Ortiz, 2004).

Los ovarios secretan dos grupos principales de hormonas esteroides, los estrógenos y los progestágenos (Ross & Pawlina, 2016). Los estrógenos promueven el crecimiento y la maduración de los órganos sexuales, tanto internos como externos, producen las características sexuales femeninas y actúan sobre las glándulas mamarias para promover el desarrollo de las mismas estimulando el crecimiento de los conductos y del estroma (Ross & Pawlina, 2016). Los progestágenos preparan los órganos sexuales internos, sobre todo el útero, para llevar a cabo la gestación. Promueven la secreción glandular por parte del endometrio, así como la proliferación de los lobulillos de la glándula mamaria, para la futura lactancia (Ross & Pawlina, 2016). Además, las gónadas femeninas producen andrógenos y relaxina (Motta Delgado y col., 2011).

Los folículos ováricos se distribuyen en la corteza y cada uno posee en su interior un ovocito. El tamaño de los mismos varía según el grado de desarrollo e indica el estado de crecimiento del ovocito (Ross & Pawlina, 2016), en principio los folículos se encuentran en la corteza, pero a medida que van creciendo se desplazan hacia la médula, donde se encuentran con los nutrientes necesarios para su crecimiento. Finalmente, una vez desarrollados los folículos maduros o de Graaf se desplazan hacia la corteza por donde ocurre la ovulación. El crecimiento de folículos en bovinos no ocurre al azar sino que ocurre un patrón denominado ondas de crecimiento folicular (Adams y

col., 1992; Motta-Delgado y col., 2011). En cada onda de crecimiento folicular, existe una población de folículos de diversos tamaños: pequeños, medianos y grandes en cada ovario, los cuales sufren un proceso de reclutamiento, selección y por último dominancia, en el cual el folículo dominante llega a la ovulación (Motta-Delgado y col., 2011). La dinámica folicular está mediada por una amplia gama de factores donde el eje hipotálamo-hipófisis-ovario-útero juega un papel importante en la regulación hormonal (Motta Delgado y col., 2011).

Los ovarios se encuentran en íntima relación con las trompas uterinas, también denominadas oviducto. Este es un órgano par, hueco y tortuoso que conecta el ovario con el útero. Su función es transportar y nutrir, a las gametas (femeninas y masculinas) y al embrión, en el caso que la fecundación sea exitosa. Se componen de tres porciones: Infundíbulo, ampolla e itsmo (Gázquez Ortiz, 2004). Histológicamente se organiza en tres túnicas: mucosa, muscular y serosa. La mucosa se compone de un epitelio cilíndrico pseudoestratificado con células ciliadas y no ciliadas, por debajo se continua con un tejido conectivo laxo (Gázquez Ortiz, 2004). Esta túnica forma pliegues longitudinales delgados que se proyectan hacia la luz (Ross & Pawlina, 2016). La túnica muscular presenta una capa de músculo liso, que se divide en circular interna y longitudinal externa, por la disposición de las fibras musculares. La serosa es la capa más externa y se compone de tejido conectivo laxo, recubierto por un mesotelio (Gázquez Ortiz, 2004). El infundíbulo presenta forma de embudo y posee prolongaciones denominadas fimbrias, su función es la captación del ovocito en el momento de la ovulación. La ampolla es la sección intermedia de la trompa en la cual se lleva a cabo la fecundación. El itsmo es la porción que desemboca en el cuerno uterino y posee un gran desarrollo de la capa muscular, debido a que su función es realizar contracciones ascendentes para favorecer el transporte de espermatozoides hacia la ampolla y descendente para favorecer el transporte del cigoto al útero (Ross & Pawlina, 2016), acciones que se realizan en conjunto con el aparato ciliar.

El útero es el principal órgano del aparato reproductor femenino, en él se lleva a cabo la implantación, nutrición, reconocimiento del embrión, formación

de membranas placentarias y desarrollo del feto. Brinda un ambiente adecuado para llevar adelante la gestación y permite la expulsión del feto y de la placenta en el parto. Se localiza en la cavidad pelviana y se conecta con el oviducto hacia craneal y con la vagina hacia caudal. Posee tres regiones: cuernos, cuerpo y cuello. Los cuernos en la mayoría de las especies son pares, el cuerpo es un segmento pequeño y el cuello es una estructura rígida compuesta por anillos que separa el canal vaginal de la luz del útero. Es un órgano hueco e histológicamente se compone, al igual que oviducto, de tres túnicas: mucosa, muscular y serosa (Gázquez Ortiz, 2004) (Figura 2). La mucosa se denomina endometrio, posee un revestimiento epitelial cilíndrico pseudoestratificado ciliado, por debajo se encuentra la lámina propia – submucosa compuesta por tejido conectivo laxo, abundante vasos sanguíneos y glándulas tubulares ramificadas y enrolladas (Gázquez Ortiz, 2004). El endometrio posee una zona basal y una zona funcional. La capa basal o profunda, se conserva en cada ciclo estral y cumple la función de ser sustento para la regeneración de la zona funcional o superficial, la cual es eliminada en cada ciclo reproductivo. Las glándulas endometriales presentan un epitelio cilíndrico simple con células ciliadas y no ciliadas, el cual se observa con una coloración basófila. La secreción glandular se denomina leche uterina, toma una coloración acidófila que puede observarse como en la luz del órgano y provee nutrición de tipo histiotrófica al embrión en los primeros estadios hasta que se forma la placenta. El tejido conectivo subepitelial es laxo y presenta gran cantidad de células; fibroblastos, macrófagos, mastocitos, eosinófilos, neutrófilos, células plasmáticas y linfocitos (Dellmann, 1994). En los rumiantes se encuentran zonas del endometrio desprovistas de glándulas denominadas carúnculas, las cuales son los sitios de unión a los cotiledones de la placenta fetal (Gázquez Ortiz, 2004).

La túnica muscular se denomina miometrio y continua las túnicas musculares del oviducto hacia craneal y de la vagina hacia caudal. Se compone de músculo liso y se dispone en una capa circular interna y una capa longitudinal externa. En el límite de las dos capas hay abundante cantidad de vasos sanguíneos que irrigan al endometrio, especialmente en la zona de las carúnculas (Gázquez Ortiz, 2004). La túnica muscular está muy desarrollada en

el útero, ya que debe adaptarse a los cambios de tamaño de la luz en las diferentes etapas de la gestación y a realizar potentes contracciones, actuando como un sincitio en el parto para contribuir a la expulsión del feto (Ross & Pawlina, 2016). La serosa es la túnica más externa, se denomina perimetrio y está formada por tejido conectivo laxo revestido por una capa de células mesoteliales.

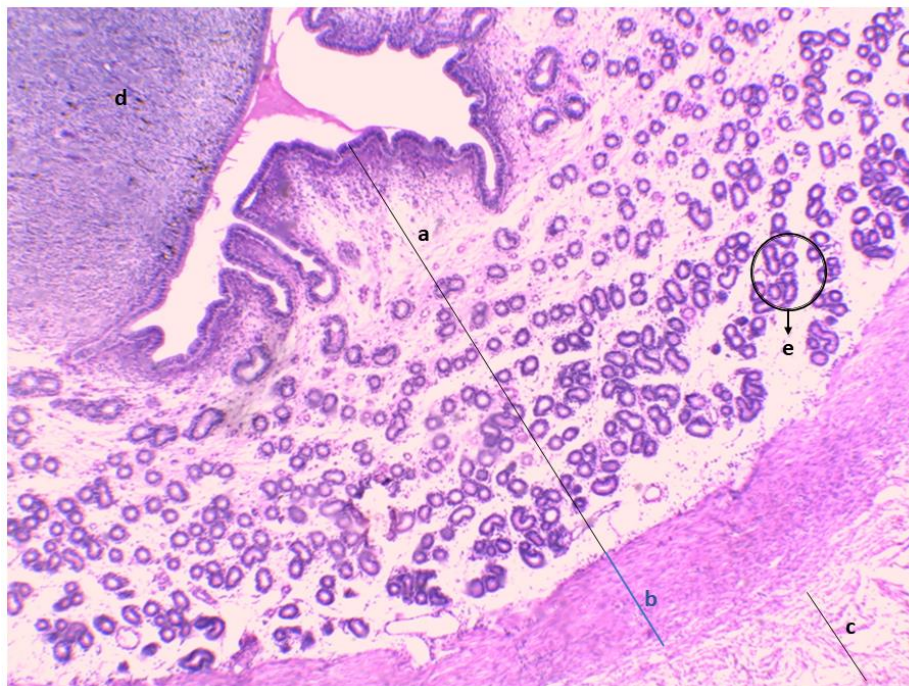


Figura 2. Microfotografía, corte histológico de útero. En la figura se puede observar el endometrio (a), miometrio (b) y perimetrio (c), así como las carúnculas (d) y glándulas (e). Corte coloreado con Hematoxilina-Eosina. Magnificación: 40 X.

El cuello uterino o cérvix, posee las mismas túnicas que el cuerpo y los cuernos uterinos. La mucosa y lámina propia se pliegan hacia la luz, en la vaca se forman 4 pliegues primarios circulares con pliegues secundarios y terciarios. La túnica mucosa presenta un epitelio cilíndrico simple ciliado con células caliciformes que secretan mucina. En los rumiantes en la lámina propia hay glándulas de tipo tubulares simples que segregan moco durante el estro y la gestación. La capa circular interna del cérvix de la túnica muscular presenta gran cantidad de fibras elásticas, tanto el músculo como las fibras son

necesarias para favorecer los cambios de diámetro del cuello en las diferentes etapas del parto y puerperio. Externamente el cuello se recubre por una túnica serosa compuesta por tejido conectivo laxo y células epiteliales planas.

La vagina es un órgano de tipo tubular, que conecta el cuello con el vestíbulo vaginal. Histológicamente está formada por las túnicas mucosa, muscular y serosa. La mucosa presenta un epitelio plano estratificado que modifica la cantidad de estratos de acuerdo a la fase del ciclo. Por debajo se encuentra la lámina propia de tejido conectivo laxo, en la cual hay gran cantidad de células de defensa al igual que en el cérvix, que conforman el tejido linfoide asociado a la mucosa, ya que el órgano se encuentra continuamente expuesto a patógenos, especialmente en el momento del coito y parto. En los bovinos en la porción anterior del epitelio vaginal hay presencia de células de tipo caliciformes que secretan mucina (Gázquez Ortiz, 2004). La túnica muscular posee las mismas capas que el útero. Hacia craneal la vagina se encuentra recubierta por el peritoneo y hacia caudal por una túnica adventicia, que presenta vasos y ganglios nerviosos asociados.

4.2 CICLO ESTRAL

Se define como ciclo estral, al periodo de tiempo entre dos celos. Está comprendido por una serie de acontecimientos fisiológicos, anatómicos, histológicos, hormonales y conductuales, que tienen como objetivo preparar al aparato reproductor para el coito, posterior fecundación y gestación.

Como se mencionó anteriormente, hay una estrecha relación entre el control hormonal y el ciclo estral. El hipotálamo, en conjunto con la hipófisis, secreta hormonas que estimulan el crecimiento folicular y la ovulación. El eje hipotálamo-hipofisiario-ovárico regula la actividad reproductiva. El hipotálamo libera factores estimulantes o inhibidores de gonadotrofinas. La hormona estimulante de gonadotrofinas (GNRH) es un decapeptido, secretado por el grupo de neuronas del hipotálamo denominado grupo "Parvocelular" y llega a la hipófisis a través del sistema "porta-hipotalámico-hipofisiario". La GNRH

controla la liberación de las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) (Colazo y col., 2017). La FSH y LH son hormonas secretada por las células gonadotropas de la adenohipófisis. La FSH como su nombre lo indica, estimula el desarrollo, crecimiento y maduración de los folículos ováricos. La hormona LH produce la luteinización de los folículos maduros para su evolución a cuerpos lúteos. El proceso de luteinización consiste en la transformación de las células de la granulosa y teca interna que componen el folículo maduro a células glandulares productoras de progesterona.

La hembra bovina es poliestrica anual, es decir que cicla todo el año. Cada ciclo dura entre 17 a 24 días, resultando 21 días como promedio. El ciclo estral se divide dos fases; fase folicular y fase lútea. A su vez la fase folicular se divide en proestro, estro e inicio de metaestro, en ella predomina la acción del estrógeno. La fase lútea comprende parte de metaestro y diestro, fase en la cual hay actividad de la hormona progesterona secretada por el cuerpo lúteo (Holy, 1983) (tabla 1).

El proestro es la fase en la cual se da el crecimiento folicular. Este periodo procede a una fase de anestro o de lisis lútea y culmina con el inicio del estro (Rippe, 2009). En esta etapa el ovario es estimulado por la FSH y LH, los folículos a medida que aumentan su tamaño comienzan a secretar estrógeno, por lo cual la hembra expresa signos de receptividad cuando estos se incrementan. La vaca se observa inquieta, con disminución del apetito, vestíbulo rojizo, vulva tumefacta y comienza la secreción de MCV (Holy, 1983).

El estro o calor es el periodo de receptividad sexual. Es una fase de corta duración, en la cual hay una alta concentración de estrógenos en sangre que producen la aceptación a la cópula, edematización y enrojecimiento de la vulva y abundante descarga de MCV, el cual se observa filante o con apariencia de "clara de huevo". Los niveles de estrógeno aumentan en sangre y estimulan positivamente al hipotálamo (feed back positivo), conllevando a la liberación del pico de LH que desencadena la ovulación, 28 a 32 horas posteriores al inicio del celo (Rippe, 2009).

El metaestro es la fase siguiente al celo, en este periodo los signos del celo cesan, ya que descienden los niveles de estrógeno y el mucus se vuelve

más denso y opaco. En el metaestro se produce la ovulación y formación del cuerpo hemorrágico en los folículos que ovularon. Luego se forma el cuerpo amarillo o lúteo, glándula endócrina productora de progesterona (Rippe, 2009).

Posteriormente ocurre el diestro, en esta fase el cuerpo lúteo se encuentra desarrollado totalmente y secreta progesterona, hormona que produce modificaciones en el endometrio y oviducto para brindar el ambiente fisiológico necesario que permita la nutrición y nidación del embrión en las primeras instancias de vida, así como el mantenimiento de la gestación en el caso que la fecundación sea efectiva. Además, la progesterona ejerce un efecto inhibitorio en el eje hipotálamo-hipofisiario. En caso de ausencia de preñez o finalización del parto, el cuerpo lúteo se lisa por la acción de la prostaglandina (PGF₂α) que es liberada por el útero y como resultado el nivel en sangre de progesterona desciende, preparándose el organismo para un nuevo ciclo.

Tabla 1. Fases del ciclo estral de la hembra bovina.

	FASE FOLICULAR		FASE LÚTEA	
	Proestro	Estro	Metaestro	Diestro
Duración	2-3 días	16 ± 4 horas	1-3 días	10-15 días
Cambios en el aparato reproductor	Crecimiento folicular Vulva tumefacta Vestíbulo rojizo Secreción de MCV	Folículos preovulatorios Útero con tono Edematización de vestíbulo y vulva Abundante secreción de MCV filante	Ovulación Formación de cuerpo hemorrágico primero y luego lúteo Descarga MCV fluido que luego se vuelve denso y opaco	Cuerpo lúteo activo en ovario Útero sin tono No hay edema Mucosa vaginal pálida MCV denso y opaco
Cambios conductuales	Inquietud monta a otras hembras Disminución del apetito Olfateo de genitales	Receptividad sexual Pasividad a la monta Disminución apetito Olfateo de genitales Nerviosismo Bramidos	Cesan los signos de celo No se deja montar	No se deja montar
Hormona predominante	Estrógeno	Estrógeno	Progesterona	Progesterona

4.3 MOCO CÉRVICO-VAGINAL

El MCV juega un papel clave en la reproducción, ya que protege al tracto reproductor femenino manteniendo un ambiente húmedo y lubricado (Cortés y col., 2014; Cortés y col., 2016), posee factores antimicrobianos como Inmunoglobulina A (IgA), lisozima y lactoferrina que inhiben el ascenso y la colonización de bacterias (Tsiligianni y col., 2003; Cortés y col., 2016; Adnane y col., 2018b), participa en el transporte de espermatozoides formando una malla tridimensional por la cual deben migrar las gametas masculinas, actuando como barrera selectiva (Cortés y col., 2016) y modula la reacción acrosómica (Vigil y col., 2008). La cantidad producida de MCV y características del mismo varían según el ciclo reproductivo de la hembra por la acción hormonal de estrógeno y progesterona. Las características del mucus inciden directamente en el resultado de la concepción.

En bovinos el moco es continuamente producido por las células secretoras del endocérvix y por el epitelio vaginal anterior. En la mucosa de la superficie cervical hay criptas compuestas por células columnares ciliadas y no ciliadas, éstas últimas presentan vesículas de mucina almacenadas en la porción apical que se visualizan por microscopía óptica (Cortés y col., 2014; Cortés y col., 2016). Por lo cual el moco cérvico-vaginal es una sustancia formada por una mezcla de secreciones uterinas, cervicales y vaginales (Cortés y col., 2014; Adnane y col., 2018a).

4.3.1 Composición del Moco cérvico- vaginal

El MCV es un hidrogel, por lo tanto, presenta una fase acuosa y una fase sólida. La fase acuosa o soluble, está compuesta por: 92- 95% de agua, sustancias de bajo peso molecular como aminoácidos, carbohidratos, lípidos, macromoléculas solubles, úrea, electrolitos, como también se compone de proteínas y enzimas (Schumacher, 1970; Tsiligianni y col., 2002; Tsiligianni y col., 2003). La fase acuosa podría considerarse como el “plasma cervical” ya que posee muchos componentes de bajo y alto peso molecular (Schumacher, 1970).

En el MCV hay gran cantidad de carbohidratos, pero los principales detectados en lavados uterinos de vacas, cerdas, conejos, ratas y ovejas no gestantes son la fructosa y la glucosa (Zavy y col., 1982; Tsiligianni y col., 2001b). Se halló un aumento de fructosa, glucosa y ácido ascórbico en la luz uterina de cerdas y en yeguas preñadas, encontrando que la glucosa es transportada desde el aparato materno y es transformada en fructosa por el blastocito (Zavy y col., 1982).

Los lípidos proveen nutrición a las gametas masculinas y pueden proteger a los espermatozoides ante cambios de temperaturas (Tsiligianni y col., 2001b). Uno de los lípidos reportado en mucus es el colesterol (Tsiligianni y col., 2001b; Cortés y col., 2016). El colesterol conforma parte de la membrana plasmáticas de las células y es el precursor de hormonas de naturaleza esteroidea. En protocolos de criopreservación de espermatozoides el colesterol al ser adicionado, previene daños osmóticos y aumenta la fluidez de las membranas al bajar la temperatura (Glazar y col., 2009), mejorando el proceso de conservación de gametas.

El mucus se compone también de iones inorgánicos como; Na^+ , K^+ , Cl^- , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cr^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} (Tsiligianni y col., 2002). El NaCl es la principal sal (0.7%), que le otorga la fuerza iónica al MCV y en conjunto con el K^+ son responsables del fenómeno de cristalización, en el cual también participan otras sales como KCl y CaCl_2 (Macdonald, 1969a; Tsiligianni y col., 2002; Cortés y col., 2014; Cortés y col., 2016). La interacción entre estos iones es de suma importancia ya que la relación $\text{Na}:\text{K}$ dentro de las células para un óptimo rendimiento es 10-15:1, por lo cual se podría esperar esta misma o mayor proporción en el medio extracelular (Bernardi y col., 2018). Estudios recientes demostraron que en mucus de vacas no preñadas recolectados en el momento previo a la inseminación, se encontró mayor concentración de K^+ y menor concentración de Na^+ , por lo tanto una menor relación $\text{Na}:\text{K}$ que en muestras de vacas preñadas (Bernardi y col., 2018). Los iones Ca^{2+} , Mg^{2+} y Zn^{2+} tienen un importante rol en el proceso de espermatogénesis en el macho y capacitación de las gametas masculinas en el tracto reproductor femenino (Tsiligianni y col., 2002). Se han determinado Cu^{2+} , Cr^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} en

muestras de MCV, pero solo se encontró el Zn^{2+} correlacionado con una menor performance reproductiva (Tsiligianni y col., 2002).

Las enzimas también juegan un papel clave en la reproducción, ya que proveen energía para la motilidad y supervivencia de las gametas masculinas (Benbia y col., 2011). Las principales enzimas descritas en mucus son; lactato deshidrogenasa (LDH), fosfatasa alcalina (ALP), α -manosidasa, α -amilasa, β -galactosidasa, β -glucuronidasa, β -N-acetilglucosaminidasa (Tsiligianni y col., 2003; Cortés y col., 2016). Las enzimas ALP, LDH y α -amilasa están presentes en MCV y semen de humanos y bovinos, la α -amilasa produce la degradación del glucógeno y en conjunto con la LDH intervienen en la capacitación espermática (Benbia y col., 2011). Los valores encontrados de enzimas no son constantes en el mucus, sino que fluctúan en los distintos periodos ciclo estral en bovinos y mujeres; por ejemplo, la ALP disminuye en el estro y aumenta con la presencia del cuerpo lúteo, LDH y α -amilasa aumentan en las fases pre y postovulatoria y declinan cerca de la ovulación (Tsiligianni y col., 2003; Benbia y col., 2011). Se detectaron también, valores mayores de actividad de LDH en MCV de vacas con celo inducido con progestágenos y en vacas repetidoras (Benbia y col., 2011).

Las proteínas solubles presentes en la fase acuosa son lactoferrina, lisozima e IgA, encargadas de participar en el sistema de defensa del CVM (Rao y col., 1973; Adnane y col., 2018b). La lactoferrina es una glicoproteína sintetizada por epitelios glandulares, túbulos renales y PMN N (Rao y col., 1973), tiene actividad bacteriostática debido a que se une al hierro, elemento vital para el crecimiento bacteriano, privando a los microorganismos de la utilización del mismo (Levay & Viljoen, 1995). La lactoferrina forma parte de los mecanismos de defensa, ya que tiene actividad antimicrobiana sobre bacterias, virus, protozoarios, levaduras y hongos (Castrillon y col., 2011). La IgA es secretada por las células B efectoras y conforma la principal línea de defensa en las mucosas, bloquea la adhesión de microorganismos a las células epiteliales excluyendo patógenos y bacterias comensales (Cerutti y col., 2011). Si el agente patógeno atraviesa la barrera epitelial la Inmunoglobulina G actúa como segunda línea de defensa (Cerutti y col., 2011). La lisozima es una proteína que forma parte del sistema inmune innato, presenta actividad

antibacteriana, antiinflamatoria, analgésica, antiviral, antioxidante y antitumoral (Carrillo, 2013). Es secretada en diversos tejidos y fluidos como; leche, saliva, lágrimas, moco y por células de defensa; PMN N y macrófagos (Carrillo, 2013). Su acción antibacteriana se debe a que rompe las paredes de las bacterias Gram-positivas, produciendo lisis celular (Carrillo, 2013).

La fase sólida o fase insoluble, se compone proteínas que provienen del suero y del epitelio glandular (Gibbons, 1959; Tsiligianni y col., 2001b). Las proteínas son secretadas por las células no ciliadas de las criptas de la mucosa cervical y parte anterior de vagina en la hembra bovina. Estas son glicoproteínas mucinas de alto peso molecular (Tsiligianni y col., 2001b; Cortés y col., 2016). Las fibras de mucina se entrecruzan y agrupan formando estructuras de 10 a 40 MDa de tamaño y se glicosilan a través de residuos de treonina, prolina y/o serina (Adnane y col., 2018b), poseen dominios con cisteína que forman puentes disulfuro entre monómeros creando multímeros y cadenas de oligosacáridos ligados que aumentan el peso molecular otorgándole mayor volumen y viscosidad al mucus. Además se componen de azúcares con residuos sulfatos y ácido salicílico que le otorgan protección contra enzimas bacterianas (Curlin y col., 2013). Los genes que codifican este tipo particular de proteínas en humanos y animales se denominan genes "MUC". Se han identificado expresados en el tracto respiratorio, gastrointestinal y reproductor (Curlin & Bursac, 2013). Hay tres tipos de mucinas; pequeñas solubles, formadoras de gel y mucinas transmembrana, las MUC2, MUC5AC, MUC5B Y MUC6 son las secretadas o formadoras de gel y forman la estructura del MCV (Curlin & Bursac, 2013).

Las moléculas de moco se unen formando una red tridimensional, o malla que cambia su estructura según la fase del ciclo estral y en la cual queda la fase soluble entre los "agujeros" que se forman (Curriá, 2010). En el estro las mucinas se disponen en forma de filamentos, que conforman canales y poros (Curriá, 2010; Cortés y col., 2016), disposición que le permite a los espermatozoides el ascenso hacia el útero. En la fase lútea, forman una malla de tipo fibrosa y densa, que resulta impenetrable para las gametas masculinas (Curriá, 2010; Cortés y col., 2016).

Hay diferentes tipos de moco producido en mujeres y animales, que varía en estructura y función según el sitio de producción. Las células epiteliales secretoras se encuentran distribuidas a lo largo de la mucosa cervical en criptas, estructuras productoras de moco del cérvix que se encuentran conformadas por varios tipos de criptas: L, S, P Y G (Odeblad y col., 1983; Odeblad, 1977). El mucus que secretan recibe el mismo nombre (L, S, P y G), además existen células F que se cree que actúan como células madres (Curriá, 2010). Al realizar extendidos de MCV, al microscopio óptico pueden observarse que los distintos tipos de moco cristalizan formando estructuras diferentes. La cristalización es un fenómeno que ocurre al desecar el MCV, en el cual se forman arreglos geométricos. Este fenómeno se da en sustancias que poseen proteínas y electrolitos, como por ejemplo la saliva, y se produce por un cambio de solución líquida a sólida, que precipita en forma de cristales (Cortés y col., 2014). En primer lugar ocurre la agregación de moléculas para dar lugar a la nucleación y luego se produce el crecimiento del cristal (Cortés y col., 2014). Al observarse los arreglos al microscopio óptico los cristales forman estructuras ramificadas que se asemejan a una hoja de helecho, por ello se ha denominado “arborización” o “fenómeno de helecho” (Cortés y col., 2014). El primer autor en abordar esta temática fue Papanicolau, el cual describió la relación entre el tipo de cristales observados y el momento de la ovulación en mujeres. Posteriormente Albusineina y col., tomando en cuenta la forma de los cristales, desarrolló una clasificación para el ganado bovino, proponiendo una cristalización de tipo A, B y C, la cual relacionó con las características del MCV y estado hormonal de la hembra (Abusineina, 1962). Otra clasificación vigente de este fenómeno, es la descrita por Bishnoi (Bishnoi y col., 1982) y utilizada por Tsiligianni, en numerosos estudios en hembras bovinas, la cual se basa en una escala del 0 al 4 (Tsiligianni y col., 2000); siendo 0= no se observó formación de cristales, 1= formación de cristales atípicos, 2= se observan la mayoría de cristales atípicos y pocos típicos, 3= mayoría de cristales típicos y pocos atípicos, 4= todos los cristales observados son típicos. El fenómeno de cristalización se encuentra regulado por la concentración de hormonas sexuales en sangre, siendo máxima en el momento cercano al estro, debido a que el estrógeno estimula la cristalización y la progesterona la disminuye (Cortés y col., 2014). Por ello se ha utilizado el

estudio de los patrones de arborización para determinar el momento óptimo de inseminación en mujeres y animales (Tsiligianni y col., 2000; Savia y col., 2016; Bernardi y col., 2018).

Otras características que varían con el nivel hormonal son la cantidad de MCV, viscosidad, materia seca, porcentaje de agua, concentración de iones y elasticidad. Como se mencionó anteriormente, una de las funciones del MCV es mantener un ambiente lubricado y húmedo en el aparato reproductor femenino, para que en el momento del coito no se dañe la mucosa de la hembra. Además es necesaria una gran cantidad de MCV para que los espermatozoides alterados sean filtrados y las gametas móviles puedan seguir su camino ascendente hacia el encuentro con el ovocito, por ello en la fase folicular los estrógenos estimulan la secreción de moco (Holy, 1983), el cual posee en este periodo del ciclo menor viscosidad y materia seca, así como mayor elasticidad y porcentaje de agua. Además, esta hormona de naturaleza esteroidea estimula el metabolismo de las criptas cervicales produciendo un incremento en la secreción de electrolitos, lo cual promueve la cristalización (Pluta y col., 2012). En la mitad del ciclo, se reportó que el MCV presenta un 98% de agua y un 50% de sales en la materia seca (Macdonald, 1969b; Cortés y col., 2016), momento en el cual las gametas masculinas pueden migrar a través de los hilos de mucus. La progesterona inhibe la secreción de MCV, el metabolismo de las criptas, aumenta la concentración de materia seca y disminuye el porcentaje de agua, por lo cual aumenta la viscosidad de la secreción, previniendo la migración espermática (Cortés y col., 2016). Cuando la vaca esta preñada el moco se torna espeso y adhesivo, formando una barrera que sella y protege la luz uterina. Se ha reportado que el moco de vacas preñadas presenta un 10% de residuo seco y 90% de agua (Macdonald, 1969a; Cortés y col., 2016).

Estudios de mucus en bovinos y mujeres han revelado que la concentración salina del fluido determina la consistencia y le otorga la capacidad de migrar a los espermatozoides a través de este (Macdonald, 1969a). En la fase folicular los canales de Cl^- y los cotransportadores Na-K-Cl ubicados en las células epiteliales de la mucosa cervical, aumentan su actividad (Pluta y col., 2012). Se registraron valores mayores de Ca^{2+} y K^+ en

fluidos oviductales y vaginales en el momento cercano al estro (Tsiligianni y col., 2002). Se han encontrado en estudios recientes, mayor concentración de K^+ y Mg^{2+} en muestras de MCV de hembras repetidoras, obtenidas al momento de la inseminación (Savia y col., 2016), lo cual refleja un desbalance electrolítico.

Otra característica muy importante del MCV es el pH, el cual sufre modificaciones en el ciclo estral, tomando valores cercanos a 7 en el momento del estro (Tsiligianni y col., 2001a). En el ganado bovino se han reportado en procesos inflamatorios un aumento del pH (Marschke & Kitchen, 1985; Cheong y col., 2012). El valor del pH al momento del coito o inseminación es un factor clave en la interacción moco-esperma, ya que bajos niveles de pH se asocian con inmovilidad espermática (Eggert-Kruse y col., 1993). Se ha reportado una disminución de la tasa de preñez en vacas con aumento de valores de pH en el mucus (Abd-ElHafeez y col., 2020). La determinación del pH puede realizarse de manera rápida utilizando tiras reactivas y se recomienda su utilización para la evaluación de la fertilidad en humanos (Eggert-Kruse y col., 1993).

En medicina veterinaria, la refractometría es una técnica muy difundida para determinar el contenido de sólidos totales (ST) de muestras biológicas (Savia y col., 2021). El refractómetro comercial, tiene una escala de ST se utiliza para estimar la gravedad específica de la orina, estimación de agua en suero y concentración de proteínas totales en plasma (Rodríguez, 2018). La refractometría no se ha utilizado para determinar el porcentaje de ST en el fluido uterino (Van Schyndel y col. 2018). En muestras de lavados uterinos de vacas con endometritis subclínica, se ha encontrado un aumento de la concentración de proteínas inflamatorias de fase aguda e interleuquinas (IL) como IL-6, IL-10 y haptoglobina, al compararlo con muestras de vacas sanas (Brodzki y col., 2015). También se encontró una asociación entre los valores de pH y proteínas elevados, y resultados positivos de lecturas de tira reactiva para leucocitos, en muestras de lavados uterinos de vacas con endometritis subclínica (Cheong y col., 2012). Como se mencionó anteriormente, la técnica de lavado es una técnica compleja que requiere introducir una solución en la luz uterina con riesgo de inflamación, por lo cual es necesario determinar las características de vacas con endometritis en un fluido que aporte información

del estado reproductivo, que sea fácil de obtener y no produzca daño al aparato reproductor en la toma de muestra, como el MCV.

4.4 ENFERMEDADES DEL APARATO REPRODUCTOR EN EL POSTPARTO

Las patologías reproductivas luego del parto, son muy frecuentes ya que en el periodo de transición de la vaca lechera ocurren una serie de eventos metabólicos e inmunitarios, que favorecen su desarrollo.

En las semanas previas al parto las demandas metabólicas del feto aumentan y la materia seca (MS) consumida disminuye un 20% debido a la reducida capacidad ruminal (Gilbert, 2016). La hembra bovina debe adaptarse rápidamente a numerosos cambios fisiológicos, ya que pasa de un estado de vaca seca sin producción láctea, con reducido consumo de MS y poca capacidad ruminal, a tener que movilizar todas sus reservas para lograr la expulsión del ternero, eliminación de la placenta, producción de calostro y además debe adaptarse a la nueva dieta de ordeño; que contiene mayor Kg de MS, así como un elevado contenido energético y proteico. El problema se da cuando la ingesta de alimentos no logra satisfacer los requerimientos del animal. Generalmente, en estas circunstancias, se produce un balance energético negativo (BEN) que requiere movilización de reservas (Roche y col., 2009), lo cual conlleva a; la utilización de grasa de los tejidos para obtener energía, liberación de ácidos grasos al torrente sanguíneo y aumento de cuerpos cetónicos en sangre. Los altos niveles de ácidos grasos libres y el aumento de la hormona somatotropina, antagonizan durante este período la acción de la insulina y producen insulinoresistencia que inhiben la utilización de glucosa por los tejidos extramamarios y reservan al nutriente para la síntesis de leche (Baeck, 2012). Si la hembra no alcanza los requerimientos necesarios, puede producir un cuadro de cetosis (clínico o subclínico) y alteración de la función hepática. Los fenómenos postparto metabólicos, inmunitarios y hormonales, se asocian con enfermedades infecciosas, trastornos

reproductivos, baja en la producción de leche, alteraciones metabólicas y muerte de animales (Ospina y col., 2010; Gilbert, 2016). Hammon y col., (2006) reportaron valores más elevados de ácidos grasos no esterificados (NEFA), en muestras de sangre tomadas previas al parto de vacas que presentaron ES, EC y metritis en el periodo de espera voluntario.

La luz uterina puede sufrir contaminación microbiana luego del parto (Sheldon y col., 2009), la cual se asocia con un impacto negativo sobre la salud y la productividad de la hembra bovina (Sheldon y col., 2008). Los patógenos que se asocian frecuentemente a infecciones uterinas son: *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes*, *Fusobacterium necrophorum* y *Prevotella spp.* (Sheldon y col., 2008; Wagener y col., 2017). También pueden actuar otros microorganismos como *Pseudomona spp.*, *Clostridium perfringens*, *Bacteroides melaninogenicus*, *Streptococcus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Staphylococcus epidermidis*, *Herpesvirus bovino tipo 4* y *Micrococcus spp.*, (LeBlanc y col., 2002; Kasimanickam y col., 2004; Sheldon y col., 2008; Sheldon y col., 2009; Rinaudo, 2012; Madoz y col., 2013; Wagener y col., 2017). Las infecciones en general son resueltas por los mecanismos de defensa del órgano, pero cuando ocurre un desequilibrio entre la infección y los mecanismos antimicrobianos, puede desencadenar patologías reproductivas como; metritis, endometritis y piómetra (Földi y col., 2006). Los factores de riesgo para que se produzca infección uterina son: retención de placenta, gemelos, distocia, alteraciones en el entorno del parto y dieta desbalanceada (Sheldon y col., 2006).

Las inflamaciones del útero pueden involucrar una capa o varias capas agravando el cuadro. Cuando afecta todas las capas del útero incluyendo la serosa se denomina **Perimetritis**, y si además involucra los ligamentos suspensorios **Parametritis**. La **Metritis puerperal** es una entidad en la cual se afecta la pared del útero y requiere ser tratada inmediatamente, ya que es de tipo sistémica y aguda. Se desarrolla en los primeros 21 días postparto, pero se presenta generalmente en los primeros 10 días y produce; descargas marrones-rojizas con olor fétido, agrandamiento y flacidez de la matriz, depresión del animal, fiebre y disminución de la producción láctea (Gilbert, 2016). Cuando la enfermedad uterina no produce signos sistémicos, pero si presenta descarga purulenta previo a los 21 días postparto se denomina

Metritis clínica (Sheldon y col., 2008). Si el contenido purulento no puede ser eliminado del útero debido a un cierre del cérvix y hay presencia de un cuerpo lúteo activo en vacas sin ciclicidad, se denomina **Piómetra**. Esta entidad afecta a un 4% de las vacas en producción (Sheldon y col., 2006) y se relaciona con la presencia de *Trueperella pyogenes* y *Fusobacterium necrophorum* (Gilbert, 2016).

Cuando la inflamación afecta la mucosa o endometrio se denomina **Endometritis**. Se describe como una enfermedad de tipo localizada, ya que no presenta signos sistémicos, que dependiendo de la presencia o ausencia de signos clínicos se define como **Endometritis clínica (EC) o subclínica (ES)**. La EC se caracteriza por descarga de tipo purulenta o mucopurulenta, pero a diferencia de la metritis puerperal no presenta signos sistémicos y se desarrolla a partir de los 21 días postparto (LeBlanc y col., 2002; Sheldon y col., 2006). La prevalencia de endometritis en los 40-60 días postparto es de 26% (Gilbert, 2016). La endometritis subclínica se caracteriza por ausencia de signos clínicos e infiltrado de PMN N en el útero (Sheldon y col., 2006). Los PMN N provenientes de la sangre circulante son atraídos por citoquinas y quimiocinas para llevar a cabo la posterior eliminación de los agentes microbianos (Sheldon y col., 2009). La función de los neutrófilos en el periparto está deteriorada (Hammon y col., 2006), debido a que ocurre una supresión del sistema inmune 1 a 2 semanas previas al parto hasta 3 semanas postparto (LeBlanc, 2008). Los efectos hormonales y energéticos de la lactancia parecen ejercer un efecto inmunosupresor que se suma a los asociados con el propio parto (Kimura y col., 1999). El BEN que padecen las vacas durante el posparto provoca un deterioro en las funciones de la inmunidad innata, dificultando la respuesta ante las infecciones uterinas en el posparto (LeBlanc, 2008) y favoreciendo el desarrollo de endometritis. Se cree que esta disfunción metabólica e inflamatoria afecta la función de los PMN, la capacidad para sufrir apoptosis, necrosis y abandonar la cavidad uterina (Lietaer y col., 2023; Wagener y col., 2017). La ES se considera como un proceso inflamatorio del útero, con desproporcionada producción de sustancias antiinflamatorias y proinflamatorias (Quintela y col., 2017).

La **Descarga vaginal purulenta**, se da cuando hay descarga de tipo purulenta o mucopurulenta por vulva (Dubuc y col., 2010; Gilbert, 2016), puede deberse a procesos inflamatorios del cérvix, útero, vagina o vejiga. Es frecuentemente consecuencia de complicaciones obstétricas (Gilbert, 2016). La cervicitis es la principal causa de esta descarga en ausencia de endometritis (Gilbert, 2016).

4.5 PROBLEMAS ASOCIADOS A ENDOMETRITIS

Las infecciones uterinas postparto se traducen en pérdidas de eficiencia para el sistema productivo. La metritis y endometritis aumentan los días al primer servicio, disminuyen la tasa de concepción y por ende la tasa de preñez, alterando los índices reproductivos del rodeo. Kasimanickam y col., (2004) registraron una menor proporción de hembras preñadas, menor porcentaje de concepción en la primera inseminación artificial y mayor cantidad de días abiertos en hembras con ES, al igual que Madoz y col., (2008) que informaron un aumento de 52 días abiertos y menor porcentaje de vacas preñadas a los 120 días postparto (Madoz y col., 2008; Plöntzke, y col., 2010).

Las hembras que presentan descargas vaginales anormales tienen más probabilidades de presentar problemas en la reanudación de la actividad ovárica postparto (Sheldon y col., 2009). Se reportó que las hembras con EC presentaron un intervalo parto concepción 32 días más largo en promedio que las hembras sanas, retraso en la aparición de celo y mayor riesgo a reducción de preñez en el primer servicio (30%) (LeBlanc y col., 2002). La ES afecta al 35-50% de las vacas entre 35 y 60 días en leche (DEL) y se asocia con una tasa de preñez reducida, aumentando el tiempo en que la vaca logra la preñez (30-88 días) y la proporción de hembras que no logran preñarse antes de 300 DEL en un 20% (Kasimanickam y col., 2004, Gilbert y col., 2005). Estudios realizados en Argentina, no presentaron diferencias entre los días a la primera inseminación en vacas con y sin ES, esto es debido a que al no presentar signos clínicos los animales son inseminados por el operador (Plöntzke y col.,

2010; Rinaudo y col., 2017) pero sí presentaron una reducción del 16,2 % en la tasa de concepción al primer servicio (Madoz, 2012). Se reportaron diferencias entre los días del intervalo parto concepción entre vacas con estatus uterino sano (113) y hembras con endometritis subclínica (166) (Rinaudo y col., 2012). Resultados que concuerdan el trabajo publicado por Kasimanickam y col. (2004), en el cual las vacas con ES tuvieron tasas de concepción menores en el primer servicio y en los posteriores, que las vacas sin ES. Según el análisis económico realizado en el año 2014 por de la Sota y col. en Argentina, el aumento en los días de vaca vacía, representa una pérdida económica de U\$44.3 a U\$82.6 por vaca/lactancia. Lo cual genera un costo de 11 a 20.5 millones de dólares anuales si calculamos las pérdidas a nivel nacional según rodeos en ordeño en Argentina (de la Sota y col., 2014).

La endometritis subclínica se relaciona con fallas en protocolos de transferencia embrionaria, ya que se encontró una correlación negativa entre el porcentaje de PMN N obtenidas por citocepillo con el porcentaje de embriones aptos obtenidos en procedimientos de lavado y transferencia (Drillich y col., 2012), así como una disminución del porcentaje de preñez en vacas con ES (Barnes y col., 2023). Resultando en una disminución de óvulos fecundados y de la viabilidad embrionaria (Fernandez-Sanchez y col., 2014).

Además de reducir la eficiencia reproductiva, las infecciones uterinas disminuyen el consumo de alimento, lo que se relaciona con una menor composición proteica de la leche, conllevando a una menor producción láctea. Así como aumenta la pérdida de animales por sacrificio, que puede llegar a un 30% en vacas con endometritis (Kasimanickam y col., 2004).

El impacto económico de las enfermedades uterinas sobre el sistema de producción lechera, se debe a múltiples problemáticas que causan; infertilidad, aumento de descartes de hembras que no pueden lograr la preñez, baja de producción de leche y costo de tratamientos médico e incluso la muerte en casos de metritis y septicemia. Se ha calculado que el costo anual de los problemas uterinos en la Unión Europea es de 1.400 millones de euros y en los Estados Unidos es de 650 millones de dólares (Sheldon y col., 2009).

4.6 TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS DE ENDOMETRITIS

Para el diagnóstico de endometritis se utilizan diversas técnicas como la palpación transrectal, ecografía, vaginoscopía, citología y biopsia endometrial. El tacto rectal se utiliza de forma rutinaria en los establecimientos lecheros y de producción de carne, para el monitoreo del periodo postparto, ya que permite evaluar la involución uterina, simetría de cuernos, tono, presencia de colecta uterina y actividad ovárica. La ultrasonografía aporta datos sobre el estado de la mucosa uterina, permitiendo la evaluación del grosor, así como la visualización de contenido uterino. La vaginoscopía, consiste en la visualización del canal vaginal y entrada del cérvix utilizando un instrumento introducido por vagina, previamente desinfectado. El material del instrumento utilizado puede ser de acero inoxidable o descartable. Se utiliza una fuente de luz, que puede estar acoplada al vaginoscopio o ser externa, para observar las estructuras de interés. Esta técnica aporta datos sobre el estado de la mucosa vaginal y permite evaluar el tipo de descarga en los primeros días postparto, monitorear la eliminación de loquios y evaluar si el flujo es purulento o transparente en las siguientes semanas postparto. La palpación transrectal, ultrasonografía y vaginoscopía son implementadas rutinariamente ya que son fáciles de realizar y aportan un diagnóstico rápido, pero son utilizadas para el diagnóstico de endometritis clínica, ya que presentan baja sensibilidad para el diagnóstico de endometritis subclínica (Palmer, 2008).

La biopsia uterina si bien es una técnica que confirma el diagnóstico, ha sido asociada con una disminución de la tasa de concepción al primer servicio e infecciones posteriores a la toma de muestra (Palmer, 2008). No es una maniobra rápida, ya que requiere la toma de muestra, fijación y procesamiento de la misma. Debido al tiempo requerido para el diagnóstico, las complicaciones en la toma de muestra y los posibles efectos negativos de la técnica, no es utilizada en forma rutinaria.

La citología es la técnica con mayor confiabilidad para el diagnóstico (Barlund y col., 2008). Para lograr resultados citológicos consistentes y confiables se requiere un método en el cual; las células se conserven, se obtenga una muestra representativa de una gran área de superficie uterina y no

se genere daño en la mucosa (Kasimanickam y col., 2005). El lavaje uterino arroja una muestra amplia, pero diluida del contenido luminal, puede causar alteración celular e inflamación del endometrio (Kasimanickam y col., 2005; Barlund y col., 2008). La técnica de *cytobrush* (CB) en cambio un método más consistente, más rápido, no deja residuos líquidos en la luz uterina y permite obtener una muestra in situ sin diluir (Kasimanickam y col., 2005), por lo cual es el test con mejores resultados para diagnosticar endometritis clínica y subclínica (Palmer, 2008). Para determinar el grado de inflamación uterina, se leen las células totales de la muestra y se determina el porcentaje de polimorfonucleares neutrófilos.

Otra técnica propuesta en la última década, es el *cytotape* (Pascottini y col., 2015) la cual consiste en obtener la muestra citológica a partir de una cinta adhesiva enrollada en el extremo superior de un catéter de inseminación utilizado en la especie equina. El *cytotape* arroja resultados similares que los obtenidos con el método de *cytobrush* en hembras bovinas en cuanto al % PMN N y celularidad total. Además, ofrece mejores resultados de calidad de muestra y disminuye la contaminación por glóbulos rojos en los fondos del preparado (Pascottini y col., 2015). Esta técnica propone la toma de muestra en el momento de la inseminación artificial, pero pocos estudios la han implementado (Quintela y col., 2017).

En cuanto al punto de corte del % PMN N para el diagnóstico de endometritis subclínica y los DEL de realizada la técnica, hay diferentes opiniones según el autor y el método utilizado. Para determinar el punto de corte, el uso de una curva ROC (Característica Operativa del Receptor) es el método más aproximado, ya que determina el punto de corte con mayor sensibilidad y especificidad y correlaciona el porcentaje de PMN N encontrados con el intervalo parto concepción (de la Sota y col., 2014). Además los diversos autores, realizaron estudios en diferentes sistemas de producción lechera, de tipo intensivos y semiintensivos, por lo cual también se dificulta la comparación de prevalencia de endometritis de los resultados, ya que en sistemas de tipo estabulado la prevalencia de ES y EC en Argentina es más baja que en Europa y Norteamérica (de la Sota y col., 2014).

Como se puede observar en la Tabla 2, se encuentran diferentes puntos de cortes según el autor, que varían del 5% de PMN N al 25%, evaluando 21 a 35 DEL (Kasimanickam y col., 2004; Hammon y col., 2006; Barlund y col., 2008; Dubuc y col., 2010; Plöntzke y col., 2010; Rinaudo y col., 2012; Lopdell y col., 2011; Madoz y col., 2013; Barrio y col., 2014), 5% al 18%, evaluando de 35 a 49 DEL (Kasimanickam y col., 2004; Gilbert y col., 2005; Barlund y col., 2008; Barrio y col., 2014; Dubuc y col., 2010; Plöntzke y col., 2010; Madoz y col., 2013). Se encontraron variaciones de 1% a 4% en los puntos de corte, para diagnosticar ES luego de la séptima semana de muestreo (Madoz y col., 2013; Pascottini y col., 2015). Por lo cual, la prevalencia de ES varía según el punto de corte utilizado y el momento de muestreo para diagnóstico de la enfermedad. En Argentina se informó en muestreos de 3-5 semanas, prevalencia de ES de 38% y 21.5%, que luego descendió a 19% y 16% en las semanas 5-7 respectivamente (Plöntzke y col., 2010; Madoz y col., 2013). Para la cuenca lechera de Santa Fe, se determinó una prevalencia entre 12.5% y 25.8%, con una media del 19% (Rinaudo, 2012).

Tabla 2. Prevalencia de endometritis subclínica según autor, momento de muestreo y punto de corte utilizado. Adaptado de Quintela y col., 2017.

Autor	Método	3 - 5 Semana (%)	5 - 7 Semana (%)	Punto de corte (%)	País
Kasimanickam y col., 2004	<i>Cytobrush</i>	35.1		>18	Canadá
Dubuc y col., 2010	<i>Cytobrush</i>	19.3		> 6	Canadá
Plöntzke y col., 2010	<i>Cytobrush</i>	38		> 5	Argentina
Lopdell y col., 2011	<i>Cytobrush</i>	7		>18	Nueva Zelanda
Heidarpour y col., 2012	<i>Cytobrush</i>	13.5		>18	Irán
Rinaudo, 2012	<i>Cytobrush</i>	19		>6.18	Argentina
Madoz y col., 2013	<i>Cytobrush</i>	21.5		>8	Argentina
Barrio y col., 2014	<i>Cytobrush</i>	17.6		>18	España
Kasimanickam y col., 2004	<i>Cytobrush</i>		34	>10	Canadá
Barlund y col., 2008	<i>Cytobrush</i>		11.8	>8	Canadá
Dubuc y col., 2010	<i>Cytobrush</i>		11.1	>4	Canadá
Plöntzke y col., 2010	<i>Cytobrush</i>		19	>5	Argentina
Madoz y col., 2013	<i>Cytobrush</i>		16	>6	Argentina
Gilbert y col., 2005	Lavado		53	>5	EEUU
Hammon y col., 2006	Lavado	51.8		>25	EEUU
Barlund y col., 2008	Lavado	15.8		>8	Canadá
Cheong y col., 2011	Lavado		25.9	>10	EEUU

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Animales y localización geográfica

Se utilizaron 450 vacas lecheras Holando Argentino (*Bos Taurus*), pertenecientes a tres establecimientos lecheros de Santa Fe, ubicados en las localidades de Firmat, Casilda y Piñero. La Provincia de Santa Fe se encuentra en Argentina, situada entre los meridianos 59 y 63 y los paralelos 28 y 34" 30' de Latitud Sur. Posee una superficie total de 133.007 km² y un perímetro total de 2.126 km. Es una llanura con inclinación noroeste-sureste y presenta una altura entre los 10 y los 125 msnm. (Fuente: <http://www.unl.edu.ar/santafe/index.php/geografia.html>).

Los tres tambos incluidos en este estudio pertenecen a la cuenca lechera Santa Fe Sur (Figura 3). En cuanto al esquema de alimentación, se trata de sistemas semi-pastoriles, con una base forrajera de alfalfa (*Medicago Sativa L.*) y verdes (verano e invierno) que representa un 50% o más de la dieta diaria y un esquema de suplementación (alimento balanceado en el ordeño, forraje conservado, grano de maíz, etc).

Los establecimientos lecheros realizan dos ordeños diarios y producen en promedio 20 litros por vaca por día. La sanidad y reproducción se encuentra a cargo de veterinarios asesores. En el tambo de la localidad de Piñero y Casilda se realiza inseminación artificial a celo detectado para lograr la preñez, en cambio en el tambo de Firmat se utilizan toros Holando Argentino. En ningún establecimiento se utiliza protocolo hormonal en el periodo de fresca hasta su liberación a servicio.

Las muestras fueron tomadas en el periodo comprendido entre los años 2017-2021. Del total de hembras examinadas (n=450), se eligieron las muestras de 146 vacas que cumplían los requerimientos para ingresar al ensayo, descriptos en el punto 5.2. Se utilizaron hembras bovinas primíparas y múltiparas de 3 a 8 semanas postparto, ya que es el periodo comprendido entre la finalización del puerperio (21 días) y la finalización del periodo de espera voluntaria (45 - 56 días).

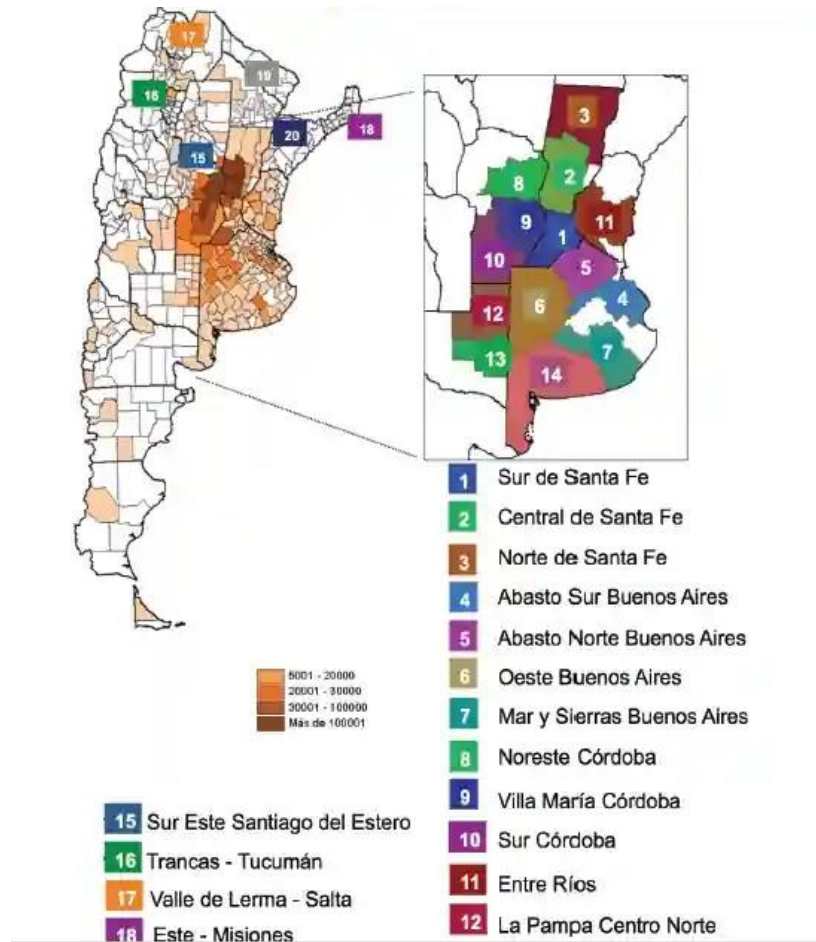


Figura 3. Imagen representativa de las cuencas lecheras de Argentina, en la cual se puede observar las cuencas Sur (1) y Centro (2) de la provincia de Santa Fe. Imagen extraída de <https://www.ocla.org.ar/>.

5.2 Examen de los animales

Los animales fueron evaluados exhaustivamente previo al muestreo y seleccionados según los puntos que se describen en el apartado (Figura 4). Las vacas que presentaron mastitis, pietín, diarrea, neumonía, problemas ruminales y/o alteraciones inflamatorias de otros órganos que no sea el útero, fueron descartadas para el muestreo.

5.2.1 Condición corporal (CC)

Se utilizó la escala de Edmonson (Edmonson y col.,1989). La cual toma valores del 1 al 5, una puntuación de 1 indica emaciación y una puntuación de 5 obesidad. Aquellos animales con escore menor a 2 fueron descartados del grupo de estudio.

5.2.2 Temperatura corporal

Se evaluó la temperatura rectal con un termómetro digital. Las hembras que presentaron rangos inferiores y superiores al valor fisiológico normal (37.5°C–39.5 °C) fueron descartadas del grupo de estudio. Ya que, los cambios en la temperatura pueden asociarse a diferentes procesos patológicos.

5.2.3 Aparato reproductor

El aparato genital fue revisado mediante inspección, tacto rectal, ecografía (ecógrafo EdanDus 60®) y evaluación del tipo de flujo. Los animales que presentaron anomalías del tracto reproductor fueron descartados, así como aquellos que tuvieron partos no eutócicos, retención de placenta, muerte fetal, abortos y/o otras alteraciones. Mediante el examen de tacto rectal y examen ecográfico de ovarios, en conjunto con los datos de medición de progesterona en suero, se determinó el estado del ciclo de las hembras. Se dividió el mismo en fase folicular y fase lútea.

5.2.3.1 Fase del ciclo

Para evaluar la fase del ciclo en la cual se encontraban las hembras seleccionadas a muestrear, se realizó un exhaustivo análisis del aparato reproductor y se determinó la concentración de progesterona sérica. Las muestras de sangre se obtuvieron por punción de la vena coccígea y se colocaron en tubos limpios de 10 mL, luego fueron remitidas al laboratorio donde se centrifugaron a 6682 g por 15 minutos y se almacenaron en el freezer a - 20 °C. El dosaje de la progesterona se

realizó en un laboratorio privado, mediante la técnica Quimioluminiscencia de micropartículas, kit ARCHITECT Progesterone®. El ciclo estral se dividió para su estudio en:

- a. **Fase folicular (FF):** aquellas hembras con tono uterino al tacto, mucosa vulvar rosada, ecografía ovárica con presencia de folículos en desarrollo o cercanos a la ovulación y ausencia de cuerpo lúteo activo, dosaje de progesterona sérica < 1 ng/mL.
- b. **Fase lútea (FL):** útero sin tono, mucosa vulvar blanquecina o pálida, ecografía ovárica con presencia de cuerpo lúteo activo, dosaje de progesterona sérica ≥ 1 ng/mL (Adams y col., 2008; Franco & Uribe Velásquez, 2012).

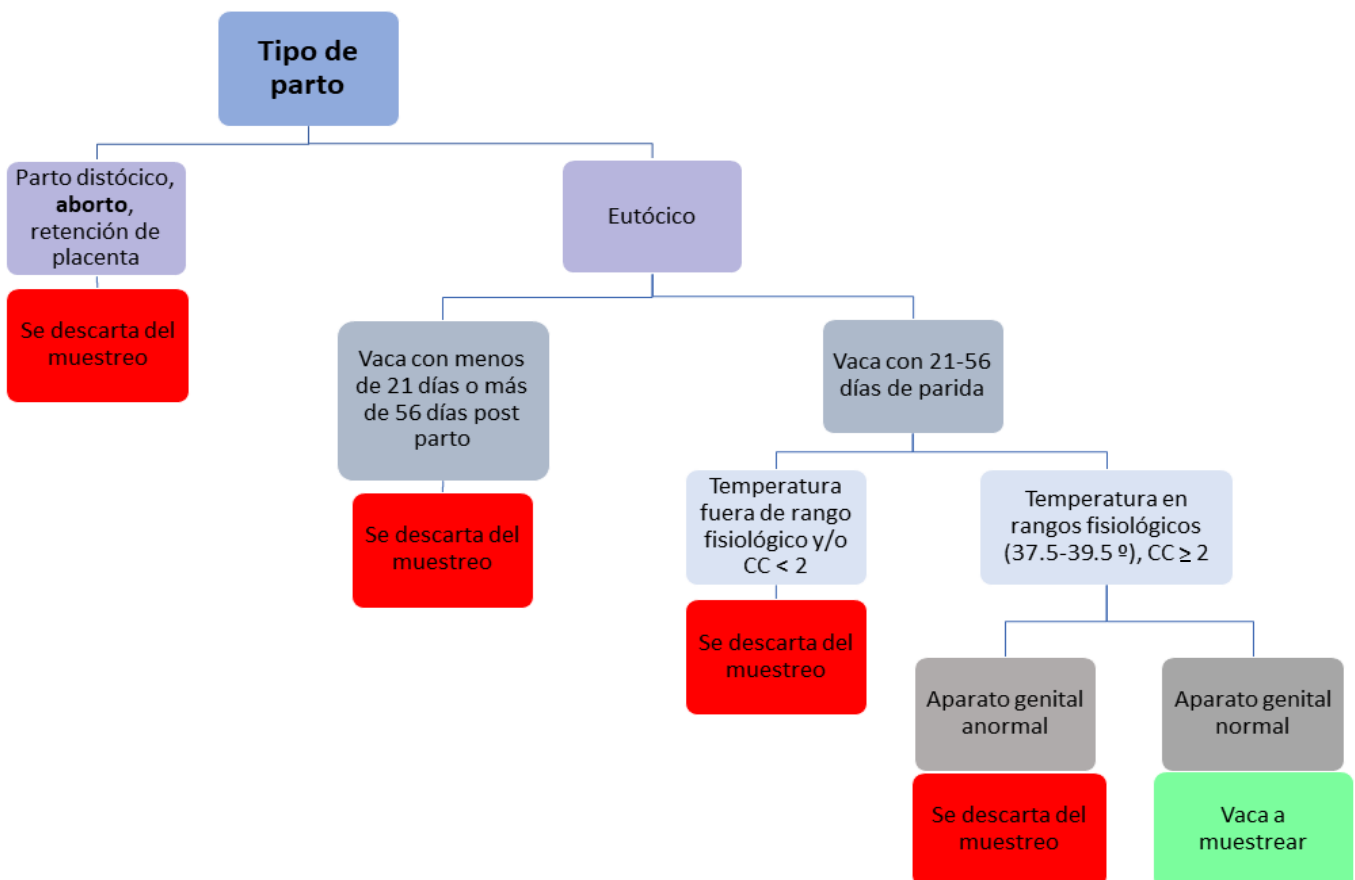


Figura 4. Esquema de clasificación de animales a incluir en el muestreo

5.3 Criterios de clasificación de Grupos Experimentales

Se trabajó con tres grupos experimentales (sanos, con endometritis subclínica y con endometritis clínica) clasificados según los resultados de la lectura de la citología endometrial obtenida mediante *Cytobrush* y el tipo de MCV obtenido.

5.3.1 Técnica de *Cytobrush*

Las muestras endometriales fueron obtenidas mediante la técnica de *Cytobrush* o cepillado endometrial, para la cual se utilizaron cepillos endocervicales (Medibrush® XL) cortados a 5 cm de largo y enroscados en una pistola de inseminación de acero inoxidable cubierta con una vaina descartable, para protegerla de la contaminación (Figura 5). La vulva se higienizó con una toalla húmeda y posteriormente se secó con una toalla de papel. Se realizó palpación transrectal con una mano y con la otra se introdujo el artefacto diseñado para el muestreo por la vagina. La toma de muestra de flujo y cepillado se realizaron conjuntamente ya que para ambas era necesario introducir la pistola en el cérvix. Una vez que el instrumento pasó el cuello uterino y se ubicó en el cuerno mayor del útero, el cepillo fue expuesto de la vaina y rotado en el mismo sentido de las agujas del reloj sobre la mucosa uterina. Luego se retrajo dentro de la vaina y se retiró la pistola de inseminación del útero. En este momento se procedió a la toma de muestra de MCV ya que la vaina plástica se dejó en el interior del útero (ver punto 5.3.2).

Una vez exteriorizado el cepillo, se rotó sobre un portaobjetos limpio (Figura 6), se fijó y se almacenó en una caja transportadora. Luego fue remitido al laboratorio en el cual se coloreó utilizando una tinción de tipo panóptica (Tinción 15®, Biopur, Argentina).

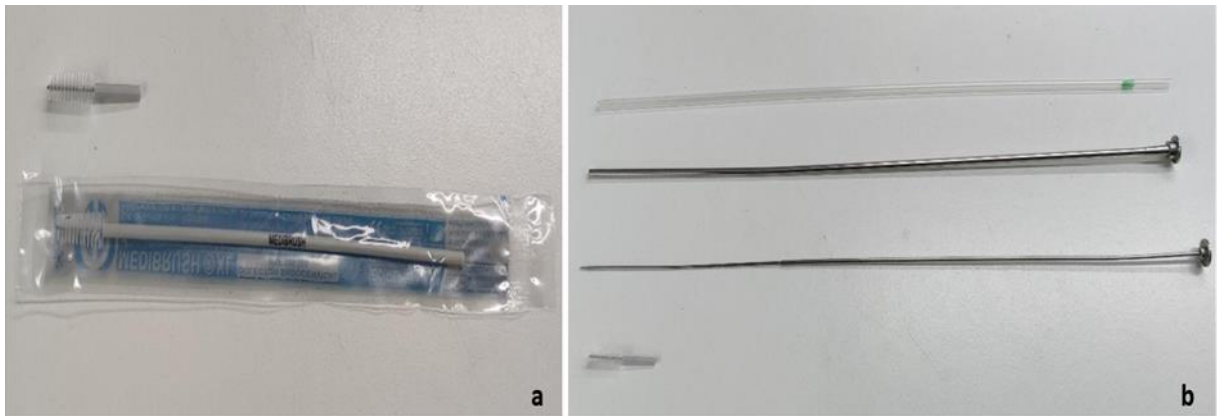


Figura 5. Elementos utilizados para toma de muestra de citología endometrial. Cepillo endocervical Medibrush® XL presentación comercial y cepillo cortado a 5 cm de largo (a). Pistola de inseminación modificada en su punta, vaina plástica y cepillo cortado (b).



Figura 6. Extendido de *cytobrush* a campo.

5.3.1.1 Tinción de muestras endometriales

Se utilizó la Tinción 15[®], variante de la tinción de Romanowsky. Su presentación es en forma de kit comercial compuesto por tres soluciones; un fijador, “solución 1” (compuestos Xanténicos) y “solución 2” (compuestos Tiazínicos). Este

tipo de tinción rápida es frecuentemente utilizada en la clínica diaria veterinaria para el procesamiento de muestras hematológicas, recuento de leucocitos, citología, estudio de extendidos de punciones, etc, ya que en 15 segundos puede realizarse la coloración del preparado, permitiendo luego del secado del mismo, una rápida lectura a comparación de otras técnicas que se utilizan de rutina, que demoran más tiempo.

Solución 1:

La solución 1 se encuentra conformada por compuestos Xanténicos y revela en una coloración rosada (eosinófila), son derivados del xanteno (compuesto orgánico heterocíclico) de color amarillo y se utilizan como base de colorantes ácidos (rodamina, fluoresceína y eosina). La eosina es un compuesto con una carga neta negativa que reacciona con los grupos catiónicos en células y tejidos, específicamente con los grupos amino ionizados de las proteínas (Ross & Pawlina, 2016). Es utilizada a escala mundial en preparados de histología y patología de tejidos, así como en tinciones celulares. Muchas veces se utilizan varios colorantes ácidos mezclados para obtener distintas tonalidades. La tinción selectiva de los componentes del tejido por los colorantes ácidos es atribuible a; el tamaño, el grado de acumulación de las moléculas del colorante, la densidad y la permeabilidad del tejido utilizado (Ross & Pawlina, 2016).

La tinción con colorantes ácidos es menos específica, pero muchas sustancias intracelulares, extracelulares y de la matriz poseen acidofilia (afinidad por lo ácido) como por ejemplo: filamentos citoplasmáticos, componentes membranosos intracelulares, la mayoría de las fibras extracelulares (Ross & Pawlina, 2016), gránulos intracitoplasmáticos de células del sistema de defensa, etc.

Solución 2:

La Solución 2 se encuentra conformada por “compuestos Tiazínicos” y produce una coloración azulada-violeta (basófila). Los colorantes básicos

reaccionan con los componentes aniónicos de las células y de los tejidos como por ejemplo; los grupos fosfato de los ácidos nucleicos, grupos sulfato de los glucosaminoglicanos y los grupos carboxilo de las proteínas (Ross & Pawlina, 2016). La capacidad de estos grupos aniónicos de reaccionar con una anilina o colorante básico se denomina basofilia (afinidad por lo básico) (Ross & Pawlina, 2016).

En el examen de la citología coloreada con Tinción 15[®] (Figura 7), las células epiteliales endometriales se observaron con un citoplasma rosado, núcleo central violeta con cromatina granular, gran relación núcleo/citoplasma y bordes citoplasmáticos definidos. En los preparados se visualizaron formando bloques (típica agregación de células epiteliales por el desprendimiento) o solas. Los neutrófilos presentaron una tinción citoplasmática rosada y el núcleo tomó coloración violeta, mostrando cromatina compacta y multilobulaciones. A diferencia de otras coloraciones utilizadas, los gránulos intracelulares se observaron teñidos débilmente.

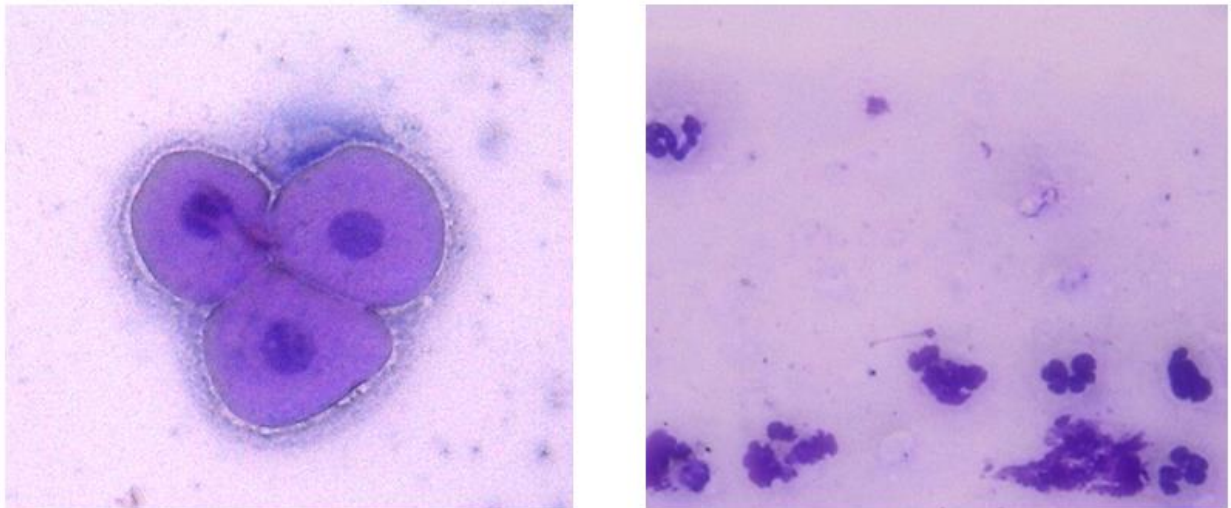


Figura 7. Microfotografía óptica de extendido endometrial. En la imagen de la izquierda se observan células epiteliales endometriales. En la imagen de la derecha se observan polimorfonucleares neutrófilos. Magnificación: 400X, Tinción 15[®], Biopur, Argentina.

5.3.1.2 Lectura de las muestras endometriales

Para evaluar el grado de inflamación endometrial, se llevó a cabo la lectura de las muestras obtenidas por el método de cepillado. Las citologías coloreadas fueron observadas al microscopio óptico binocular de campo claro (Leica DM750®) utilizando oculares de 4X, 10X y 40X. Luego se realizó un conteo de 200 células totales (células endometriales e inflamatorias) a 400 aumentos utilizando la técnica de lectura de guarda griega (Figura 8).

Para determinar el grado de inflamación se utilizó la siguiente fórmula propuesta por Rinaudo y col., (2011):

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

% PMN N: Porcentaje de polimorfonucleares neutrófilos

n PMN N: Cantidad de Polimorfonucleares Neutrófilos presentes en la preparación

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



Figura 8. Imagen esquemática de la técnica de lectura del preparado en guarda griega. "Creado con Biorender.com".

En este trabajo se utilizó el punto de corte para ES de 5% PMN N en vacas muestreadas en el periodo de espera voluntario, entre 21 y 56 DEL, de acuerdo con lo postulado por Plöntzke y col. (2010), Rinaudo y col., (2012), debido a que los ensayos se realizaron en sistemas semi-extensivos de Argentina.

5.3.2 Moco cérvico-vaginal:

Aquellos animales que presentaban temperatura en rango fisiológico, libres de anomalías reproductiva y con escore corporal igual o mayor a 2 fueron sometidos a la técnica de recolección de MCV, la cual se realizó en conjunto con la técnica de *Cytobrush*.

5.3.2.1 Recolección del MCV

Para llegar al cuello cervical se utilizó una pistola de inseminación cubierta por una vaina descartable como se mencionó en el punto 5.3.1, la cual fue introducida por la vagina. Al pasar los anillos del cuello uterino e ingresar a útero se recolectaron muestras de moco utilizando una cánula de plástico unida a una jeringa de 60 mL, ejerciendo una aspiración suave. Luego se colocaron las muestras de MCV en tubos tipo eppendorf, se enfriaron rápidamente y se transportaron al laboratorio, donde se dividieron en alícuotas y almacenaron a - 20°C para su posterior uso. En el tiempo adecuado al ser requeridas, las muestras se descongelaron a 37°C en un baño termostático con agitación durante diez minutos y se procesaron según el protocolo experimental.

5.3.2.2 Clasificación del MCV

Las muestras fueron recolectadas y clasificadas según Runciman y col., (2009) en:

- **Flujo tipo 0:** moco claro, con ausencia de pus (Figura 9).

- **Flujo tipo 1:** moco con flóculos de pus ($\leq 50\%$) (Figura 9)
- **Flujo tipo 2:** moco con flóculos de pus ($\geq 50\%$) (Figura 9).
- **Flujo tipo 3:** descarga enteramente purulenta y/o purulenta sanguinolenta, color rojo-amarronado, la cual puede estar asociada a olor fétido (Figura 9).

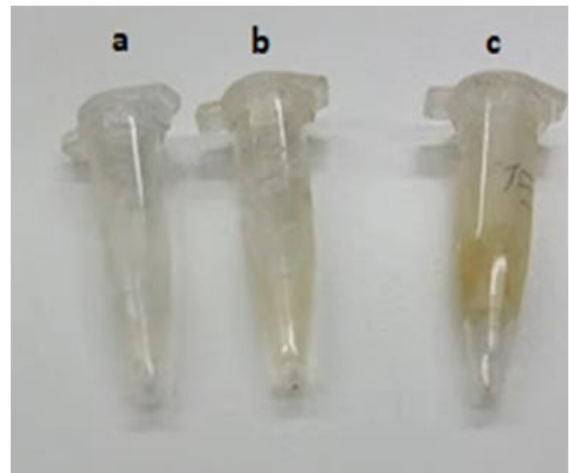


Figura 9. Moco cérvico-vaginal normal y purulento. En la imagen de la izquierda se observa un guante de tacto que recolectó flujo tipo 0. En la imagen de la derecha pueden observarse 3 tubos eppendorf con flujos de distintos tipos; flujo tipo 0 (a y b), flujo tipo purulento 1 (c).



Figura 10. Moco cérvico-vaginal purulento. En la imagen de la izquierda se observa un tubo eppendorf conteniendo flujo purulento 2. En la imagen de la derecha se observa un tubo eppendorf conteniendo flujo purulento 3.

El flujo tipo 0 se subdividió para su estudio según su aspecto en:

- **Trasparente (Tr):** moco sin flóculos de pus de aspecto transparente al observarlo a luz directa.
- **Turbio (T):** moco sin flóculos de pus que presenta turbidez al observarlo a la luz directa.

5.3.3 Grupos experimentales

Las hembras se clasificaron en tres grupos según el estatus sanitario uterino: grupo sano (S) o grupo control, grupo con endometritis subclínica (ES) y grupo con endometritis clínica (EC) (Figura 11).

- **Grupo sano:** hembras que presentaron flujo tipo 0 al momento del muestreo y citología endometrial negativa a ES.

- **Grupo Endometritis subclínica:** hembras con flujo 0 y citología endometrial positiva a ES (PMN N \geq 5%).
- **Grupo endometritis clínica:** flujo tipo 1, 2 o 3 con citología compatible con endometritis clínica.

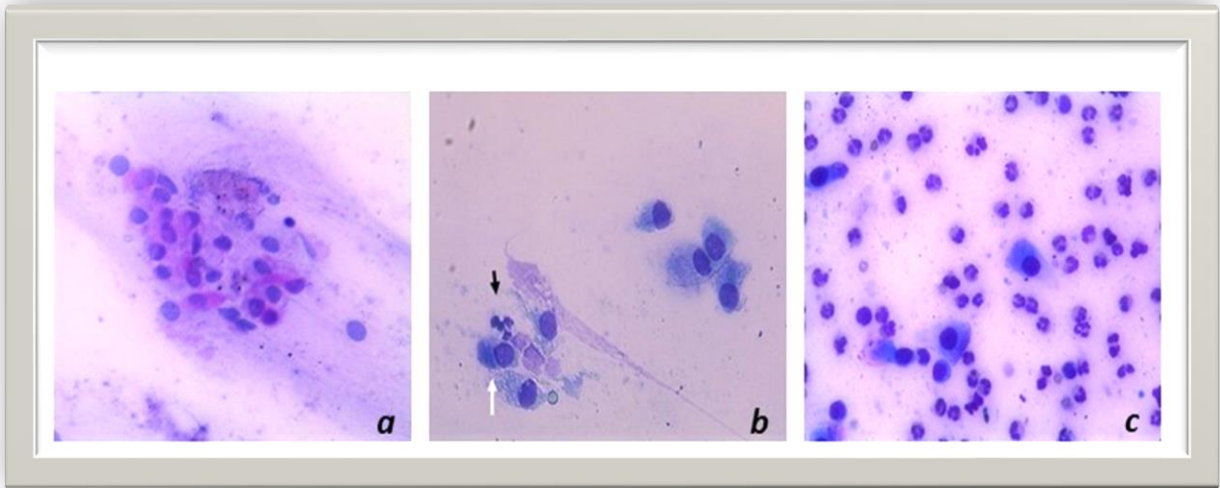


Figura 11. Fotos representativas de citología endometrial en los grupos control (a), endometritis subclínica (b) y endometritis clínica (c). La flecha negra indica PMN N y la flecha blanca una célula endometrial. Microfotografía óptica 400X, Tinción 15[®], Biopur, Argentina (Savia y col., 2021).

Se trabajó con el grupo sano, como control negativo de inflamación uterina, para determinar las características del MCV de vacas con estatus sanitario uterino sano y compararlo con el grupo ES.

Se trabajó con el grupo endometritis clínica, como control positivo de enfermedad e inflamación uterina para determinar las modificaciones del MCV y compararlo con el grupo ES.

De acuerdo a los datos obtenidos, se estimó la prevalencia de cada estatus sanitario uterino. Se evaluó la misma según condición corporal del animal y época del año (otoño, invierno, primavera) de muestreo.

Una vez clasificados los grupos de trabajo se procedió a realizar los siguientes ensayos en el laboratorio; en primer lugar, se realizaron determinaciones en muestras sin solubilizar, posteriormente se desarrolló un protocolo de homogeneización del mucus y finalmente una vez validado el protocolo, se realizaron las determinaciones bioquímicas en muestras homogeneizadas.

5.4 Ensayos realizados en muestras sin solubilizar

5.4.1 Evaluación del MCV

Se evaluó la asociación entre el tipo de flujo obtenido (0,1,2,3), el aspecto del flujo tipo 0 (transparente o turbio) y el estatus sanitario uterino.

Posteriormente se realizó un examen del MCV a microscopio óptico. En primer lugar, una gota de moco fresco se extendió sobre un portaobjeto limpio y seco. Luego se dejó secar la muestra al aire por 30 minutos y se realizó la observación de preparado, con microscopio óptico binocular de campo claro (Leica DM750®), utilizando en primer lugar un aumento de 40x y luego 100X.

Se evaluó el fenómeno de cristalización (Figura 12). Para la clasificación se utilizó una escala del 0 al 4 (Tsiligianni y col., 2000); donde 0= indica que no se observó formación de cristales, 1= formación de cristales atípicos, 2= corresponde a la cristalización en la cual hay en su mayoría cristales atípicos y pocos típicos, 3= la mayoría de cristales en forma de helecho y pocos atípicos, 4= 100% de cristales típicos.

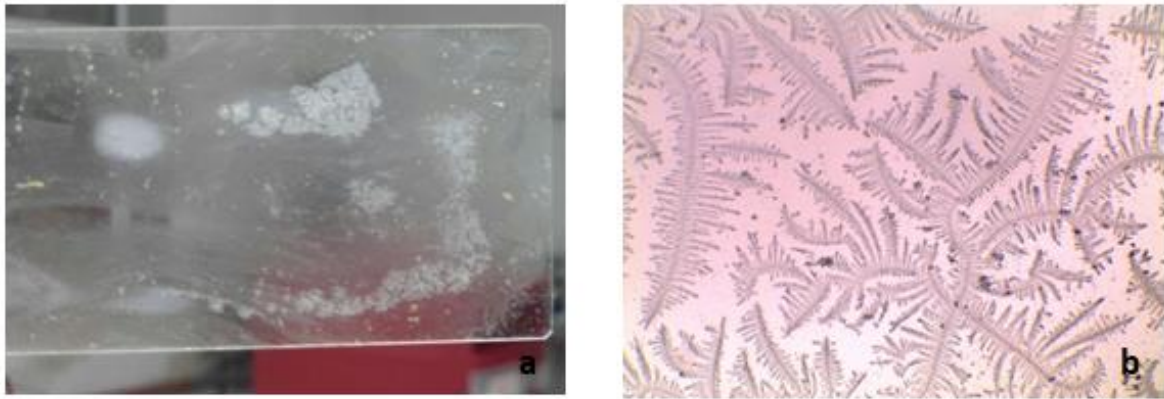


Figura 12. Cristalización de moco cérvico-vaginal. En la imagen se puede observar la desecación del mucus en el portaobjetos con precipitación de estructuras cristalinas (a) y una microfotografía 400X de cristalización del MCV (b).

Además, los extendidos de MCV se evaluaron con una clasificación propia que contempló la visualización del fondo del preparado (n=93). En relación a la presencia o ausencia de células basales, células epiteliales, inflamatorias y detritus visualizados en el fondo de extendido (FE), se clasificó en fondo de tipo:

Limpio (L): cuando se observa escasa o nula presencia de detritus y células basales. Los cristales se observan bien formados o no se observan.

Sucio (Su): cuando se observa gran cantidad de células inflamatorias y detritus celulares. Los cristales se observan bien formados o no se observan.

Luego las muestras se colorearon en primera instancia con hematoxilina durante 3 minutos y posteriormente con eosina durante 1 minuto, para reconocer estructuras celulares y corroborar la presencia de las mismas para cada tipo de fondo evaluado sin teñir (Figura 13).

Se analizó la sensibilidad (Se), especificidad (Esp), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de la técnica. Además, se evaluó la relación entre el tipo de fondo, tipo de flujo y % PMN N.

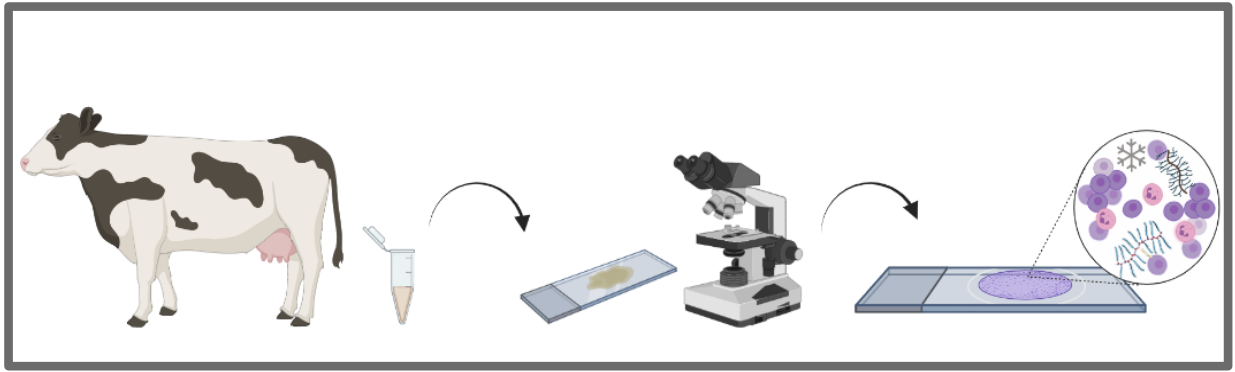


Figura 13. Esquema representativo de recolección y lectura de extendidos de MCV bovino en la cual se observan cristales, células epiteliales e inflamatorias. “Creado con BioRender.com”.

5.4.2 Determinación de pH

Se analizaron los valores de pH del moco cervico-vaginal de los tres grupos en estudio (n=100); vacas con estatus sanitario uterino sano (n=37), vacas con endometritis subclínica (n=25) y vacas con endometritis clínica (n=33). Se compararon los grupos en fase folicular (n=38) y lútea (n=35).

Para la lectura se colocó una gota de mucus sin procesar sobre un segmento de tira reactiva de pH rango 0-14 (PHI-14 TEST PAPER®) en una placa de vidrio limpia y seca (Figura 14). Se esperó 10 segundos de colocada la muestra sobre el papel tornasol y se obtuvo la determinación comparando el color obtenido con la escala otorgada por el fabricante. Una vez determinado el valor de pH se descartó el material.

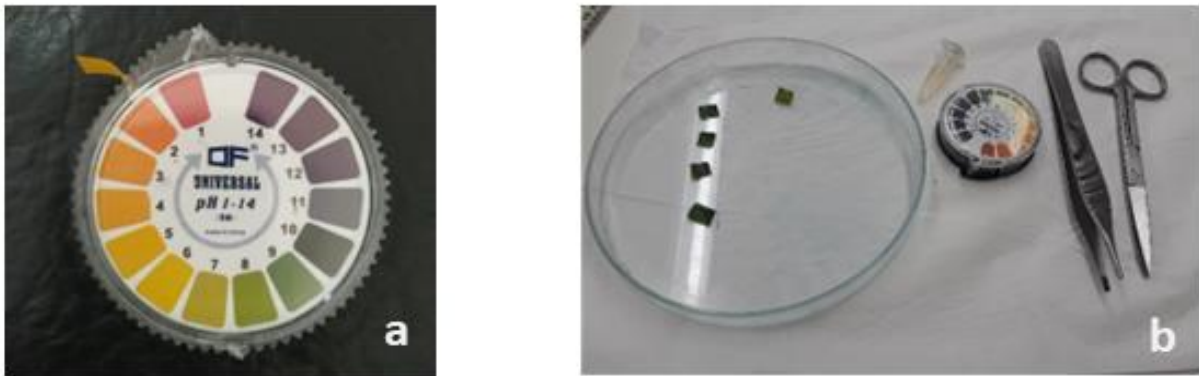


Figura 14. Elementos utilizados para la determinación de pH. Tira reactiva de pH rango 0-14 (PHI-14 TEST PAPER®) con escala otorgada por el fabricante (a). Materiales utilizados para la lectura de pH (b).

5.4.3 Utilización de Tiras reactivas

Para este ensayo se utilizaron las tiras reactivas Urine Strip Wiener lab®. Siguiendo las instrucciones del fabricante, se colocó el MCV sobre las tiras, luego se esperó 90 segundos para la lectura de todas las variables, excepto para la lectura de leucocitos en la cual se esperó 120 segundos y se obtuvieron los resultados de acuerdo a los valores de la tabla otorgada por el fabricante (Figura 15).

Se realizaron pruebas para evaluar cuales determinaciones podían utilizarse en muestras de MCV proveniente de los tres grupos en estudio (S, ES, EC), contrastando datos de la tira con los valores ya recabados por métodos de referencia de pH (n=29) y proteínas (n=29).

Para la lectura de leucocitos (n=82), se tomó como referencia la escala del fabricante y se le asignó valores de 0 (-), 0.5 (+/-), 1 (+), 2 (++) y 3 (+++) a la misma para su análisis (Figura 15). Para evaluar si el congelamiento y/o el protocolo de procesamiento modificaba la lectura de esterasa leucocitaria (LE) en la muestra, se compararon los resultados de lectura de MCV fresco y procesado (n=12).

Se realizó t- test entre el % PMN N para cada valor de actividad de LE, para analizar la relación entre las células inflamatorias presentes en CB y la actividad de

la LE. Se evaluaron los rangos 0, 0.5 y 1, debido a que pocas muestras presentaron valor 2 para incluir en el estudio.

Se analizó Se, Esp, VPP y VPN de la técnica de LE como método diagnóstico de endometritis subclínica.

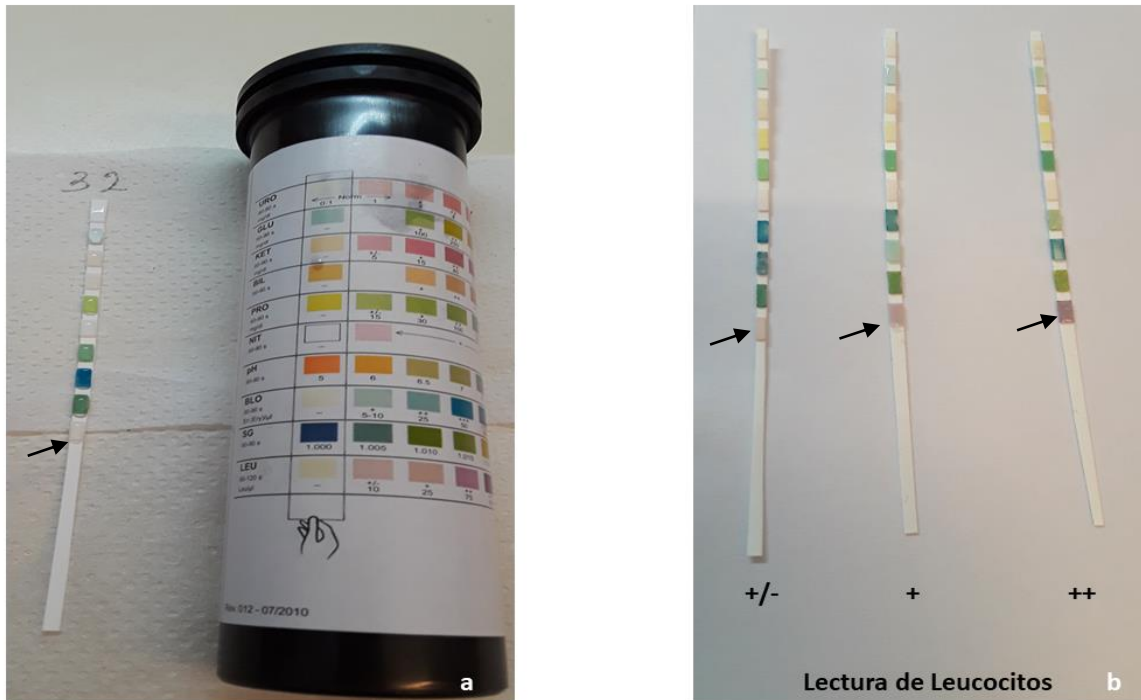


Figura 15. Tiras reactivas Urine Strip Wiener lab®. Comparación de los resultados obtenidos al colocar muestra de MCV con la escala otorgada por el fabricante, prueba esterasa leucocitaria negativa (a). Diferentes escalas de lectura positiva de esterasa leucocitaria en muestras de MCV (b). Flechas negras indican la celdilla de la tira que corresponde a esterasa leucocitaria.

5.5 Desarrollo de un protocolo de homogeneización para muestras de MCV

Protocolo de Homogeneización

Para las determinaciones bioquímicas se utilizó la porción soluble del MCV, por lo cual se desarrolló un protocolo de homogeneización del mucus debido a que este fluido es un hidrogel difícil de manipular y posee sustancias insolubles que podrían alterar las diferentes mediciones. Se utilizó un detergente no iónico suave para el procesamiento del mismo.

En primera instancia se determinó la concentración mínima de detergente que solubilice las muestras, permita su manipulación y no deje residuos. En segunda instancia se evaluó que la concentración elegida no altere las características fisicoquímicas del MCV.

5.5.1. Determinación de la concentración mínima de Triton X-100® que homogeneiza las muestras MCV y no deja residuos después de la desecación completa

Se testearon cuatro soluciones de Triton X-100® dentro del rango de concentración de 0.01 a 3% (V/V). Se evaluó la formación de espuma y la licuefacción de las muestras mediante una escala cualitativa utilizando el siguiente rango: - nada, + poco, ++ medio, +++ alto. Los residuos se evaluaron midiendo los sólidos totales obtenidos luego de desecación completa del MCV. Para este experimento se utilizó MCV del grupo sano.

Las muestras se descongelaron en baño maría a 37°C por 10 minutos. Luego cada una de las muestras (n=8) se dividió en cuatro partes y a cada parte se le adicionó las concentraciones finales de Triton X-100® de 0.01%, 0.5%, 0.1% y 3%. Posteriormente se homogeneizaron con IKA-Ultra-Turrax™ T25 Basic, a velocidad mínima durante 30 segundos y se centrifugaron durante 5 minutos a 12.000 g (Eppendorf AG™, MiniSpin™, Alemania).

Los residuos se determinaron mediante el método gravimétrico. Para ello se utilizó 200 μL del sobrenadante de las muestras, los cuales se colocaron en canastas de papel aluminio en un horno de secado de aire forzado horizontal a 90° hasta desecación completa y posteriormente se pesaron en una balanza analítica (Figura 16).



Figura 16. Equipos utilizados para la determinación de sólidos totales. Muestras de moco cérvico-vaginal en canastas papel aluminio, en horno de secado de aire forzado horizontal (a). Pesaje de las muestras en balanza analítica (b).

5.5.2 Efecto de la adición de Triton X-100[®] sobre las propiedades fisicoquímicas del mucus

Para este experimento las muestras de MCV se trataron con la concentración elegida a partir del experimento 5.5.1. Las muestras ($n=15$) se dividieron en dos, una mitad fue tratada con Triton X-100[®] concentración final 0.01% (20 μL de Triton al 0.1% + 180 μL MCV) y en la otra mitad el detergente se reemplazó con un volumen equivalente de agua destilada. Todas las muestras se homogeneizaron con IKA-

Ultra-Turrax™ T25 Basic, a velocidad mínima durante 30 segundos, luego se centrifugaron durante 5 min a 12.000 g (Eppendorf AG™, MiniSpin™, Alemania). Se utilizó el sobrenadante para las determinaciones fisicoquímicas posteriores.

Se evaluó la concentración de sólidos totales, proteínas e índice de refracción en muestras con y sin el detergente adicionado. Se utilizó el método estadístico t-Student pareado. Para corroborar que el contenido de sólidos totales obtenidos por gravimetría representaba el contenido de sólidos totales de la muestra cruda, se determinó la concentración de iones Na⁺ y K⁺.

5.5.2.1 Efecto de la adición de Triton X-100® sobre el índice de refracción

Para la medición del índice de refracción se utilizó un refractómetro de mano (ALLA FRANCE™, 95000-017, Francia) rango 1.3330 - 1.3600 (Figura 17). El refractómetro se calibró con una gota de agua destilada en el rango 1.3330 y luego se procedió a la lectura de la muestra. Se colocaron 50 µL de MCV sobre el prisma limpio y se cerró la tapa transparente, se comprobó que la muestra se distribuya homogéneamente y posteriormente se llevó el instrumento hacia una fuente de luz. La lectura se realizó observando el valor de la escala **ND** (refraction index) delimitado entre el campo claro y oscuro (azul).

Para validar los resultados se utilizó un refractómetro digital (ATAGO™ PAL-RI, catalogo N 3850, Japón), rango 1.3306 - 1.5284, ya que al ser automático evita errores del operador (Figura 17). Para la lectura de los valores de IR se encendió el aparato, se esperó unos minutos hasta su estabilización y se colocó una gota de agua destilada para su calibración. Luego se limpió el prisma con papel tisú y se cargó con 50 µL de muestra. El valor del IR apareció en pocos segundos en el visor del refractómetro. Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente, de acuerdo a lo indicado por Rodríguez y col., (2018).

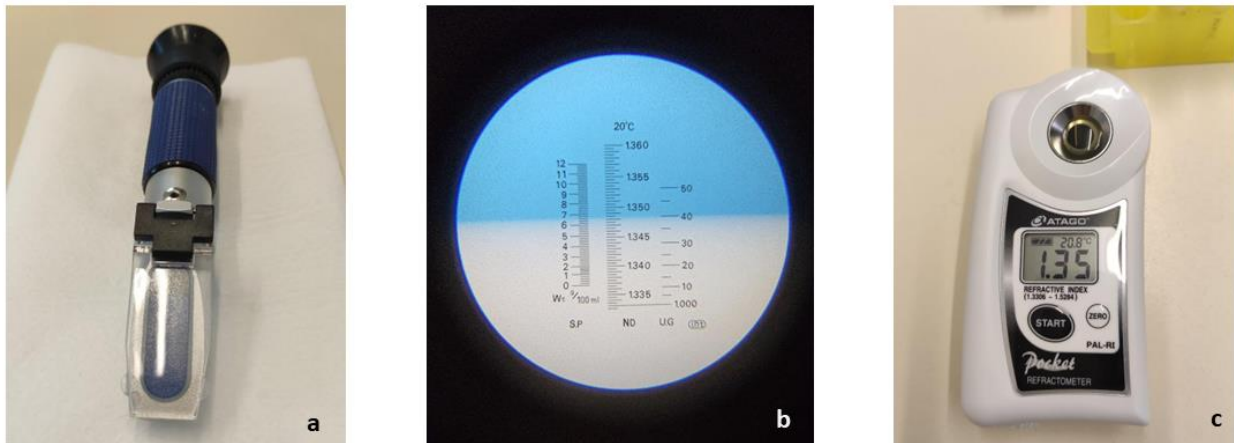


Figura 17. Refractómetro de mano ALLA FRANCE™ (a). Escala refractómetro de mano (b). Refractómetro digital ATAGO™ PAL-RI (c).

5.5.2.2 Efecto de la adición de Triton X-100® sobre la concentración de sólidos totales

La concentración de sólidos totales en muestras con y sin detergente adicionado se determinó mediante el método gravimétrico descrito anteriormente en el apartado 5.5.1.

5.5.2.3 Efecto de la adición de Triton X-100® sobre la concentración de proteínas totales

Para la determinación de proteínas totales se utilizó el método de Ácido Bicinconínico (BCA) adaptado a microplacas. Se utilizaron 5 µL de muestra de MCV. La lectura se realizó con un lector de placas TECAN F50™ a 560nm (Figura 18) en microplacas de 96 Wells (CAT # 5530200- ORANGE SCIENTIFIC™) en muestras con y sin adición del detergente (n=6).

5.5.2.4 Efecto de la adición de Triton X-100[®] sobre la concentración de iones

Se evaluó la concentración de iones Na⁺ y K⁺ en muestras con y sin detergente. La determinación de la concentración de sodio y potasio se realizó por fotometría de llama (Zentec ZF[™] 2500, Argentina) (Figura 18). Para la determinación de potasio (K⁺): se diluyó el estándar (Est) 1/200. Luego se colocó la ganancia del tubo que poseía el estándar en un valor de 5 meq/L y se calibró con valor de 0 meq/L para el agua destilada. Posteriormente, la muestra se diluyó en 1/200 y a continuación se procedió a la lectura del valor del ion en el visor del equipo.

$$[K^+] = \frac{\text{Lectura de muestra} \times \text{dilución de muestra (200)} \times [K^+] \text{ Est (5)}}{\text{Lectura Est (5)} \times \text{dilución Est (200)}}$$

$$[K^+] = \frac{\text{Lectura de la muestra} \times 200 \times 5}{5 \times 200}$$

$$[K^+] = \text{Lectura de la muestra.}$$

El mismo procedimiento se realizó para obtener la concentración de sodio. La lectura del estándar de sodio se calibró en 140 meq/L.



Figura 18. Lector de placas TECAN F50[™] utilizado para la determinación de proteínas totales (a). Fotómetro de llama Zentec ZF[™] 2500, utilizado para la determinación de sodio y potasio (b).

5.6 Ensayos realizados en muestras homogeneizadas

Una vez validado el protocolo de homogeneización se procedió a realizar las siguientes determinaciones para cada grupo experimental (S, ES y EC) utilizando la porción soluble del MCV; concentración de sólidos totales, porcentaje de agua, concentración de proteínas totales, concentración de iones, pruebas con tiras reactivas. Las muestras de MCV se descongelaron a baño maría a 37°C por 10 minutos, posteriormente se agregó el detergente no iónico Triton X-100® a una concentración final 0.01% V/V (testeada en la sección 5.5.1). Finalmente se homogeneizaron con IKA-Ultra-Turrax™ T25 Basic, a velocidad mínima durante 30 segundos y se centrifugaron durante 5 min a 12000 g (Eppendorf AG™, MiniSpin™, Alemania).

Las determinaciones bioquímicas se realizaron utilizando las mismas técnicas descritas en el punto 5.5.

5.6.1 Determinación de sólidos totales

Se determinó la concentración de sólidos totales por la técnica gravimétrica en primera instancia (n=73). Debido esta técnica requiere altos volúmenes de muestra y conlleva mucho tiempo, se procedió a probar la determinación de la concentración de sólidos a partir del índice de refracción de la muestra.

5.6.1.1 Determinación de sólidos totales a partir del índice de refracción de las muestras

Se utilizaron 30 muestras de MCV del grupo control (sano), las cuales fueron procesadas con el protocolo puesto a punto en el apartado 5.5. Luego se midió la concentración de sólidos totales mediante la técnica gravimétrica, obteniendo los valores de sólidos totales gravimétricos (gTS). Para medir el IR se utilizó un refractómetro de mano (ALLA FRANCE™, 95000-017, Francia).

Por razones gráficas, los valores del índice de refracción fueron transformados en valores de refractividad (R) mediante la siguiente fórmula:

$$R = 10.000 \times (n_s - n_0)$$

R = refractividad

n_s = índice de refracción de la muestra

n_0 = índice de refracción del agua destilada (blanco de reacción, índice de refracción de 0.01% Triton X-100®)

Luego se realizó un contraste entre los valores de gTS (g/dL) y los valores de refractividad de las muestras de MCV. Para ello se utilizó un análisis de regresión lineal entre las dos variables y se obtuvo una ecuación matemática que permitió obtener la determinación matemática de sólidos totales de las muestras de mucus, denominados “sólidos totales calculados” (cTS) a partir de los valores del índice de refracción de las mismas.

5.6.1.2 Determinación de cTS en los grupos con endometritis

Para verificar la aplicación del método expuesto en el apartado anterior se evaluó la aplicación del mismo en animales enfermos. Se utilizaron 19 muestras provenientes del grupo ES y 24 muestras del grupo EC. Se calcularon los cTS a partir de la ecuación obtenida en la sección 5.6.1.1. Posteriormente se compararon los cTS con los valores de gTS, mediante el análisis estadístico t-test pareado y análisis de correlación. Una vez validada la determinación de ST a partir del índice de refracción, la concentración de ST de las muestras restantes a procesar (n=37) se determinó mediante la ecuación matemática obtenida.

5.6.2 Determinación del porcentaje de agua

Se utilizaron 66 muestras de MCV, de los grupos sanos (n=26), ES (n=18) y EC (n=22). El porcentaje de agua se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ H}_2\text{O} = \frac{(\text{peso húmedo}) - (\text{peso seco})}{(\text{peso húmedo} - \text{peso papel})} \times 100$$

Peso húmedo: peso de muestras MCV + peso papel aluminio

Peso seco: peso de muestra desecada + peso papel

5.6.3 Determinación de la refractividad

Se utilizaron para este ensayo 106 muestras de MCV. Se midió el índice de refracción de las mismas y se aplicó la fórmula matemática explicada en el apartado 5.6.1.1, para transformar los valores de IR en R.

5.6.4 Determinación de proteínas totales

Para obtener la concentración de proteínas totales (PT) de las muestras homogeneizadas (n=98), se utilizó la técnica de Ácido Bicinconínico adaptada a microplacas (técnica explicada en el punto 5.5.2.3).

5.6.4.1 Determinación de proteínas totales a partir del índice de refracción de las muestras

Se evaluó la utilización del índice de refracción para la determinación indirecta de proteínas totales. Para ello se utilizó un estándar de albúmina bovina (1 mg/mL), en concentraciones crecientes 0.5%, 1%, 2% y 4%. Se trató a la solución de albúmina como si fuera una muestra y se le adicionó la solución de Triton X-100®

0.01% (V/V). Se midió el IR con un refractómetro manual y se construyó un gráfico de regresión lineal relacionando la concentración de albúmina (eje x) y con los valores de refractividad obtenidos (eje y).

La ecuación obtenida de la curva se utilizó para determinar los valores de proteínas totales calculadas (cPT) a partir del IR transformado en R (n=39). Mediante t-test pareado se compararon los valores de proteínas totales determinadas por método de referencia de Ácido Bicinconínico (PTBCA) y los valores de cPT.

5.6.5 Determinación de iones

Na⁺ y K⁺

La concentración de sodio y potasio en muestras de MCV homogeneizado (n=56) se determinó mediante fometría de llama, técnica explicada en el punto 5.5.2.4. Además, se determinó en el mucus la relación Na⁺/K⁺.

Magnesio

La concentración de Mg²⁺ en muestras de MCV, se obtuvo utilizando un método colorimétrico, kit Wiener MG COLOR AA[®] en microplacas de 96 wells (CAT # 5530200- ORANGE SCIENTIFIC™). La lectura se realizó con espectrofotómetro TECAN F50™ a 492 nm. En este ensayo se evaluaron 69 muestras correspondientes a los estatus uterinos; sano (n=30), endometritis subclínica (n=20) y endometritis clínica (n=19).

5.7 Análisis estadísticos

Los datos fueron recopilados manualmente y se exportaron a planillas de hoja de cálculo. Para los análisis de datos se utilizó el software GraphPad[®] Prism5. Las

pruebas estadísticas utilizadas fueron: Anova, t-test, Kruscal-Wallis, Mann Whitney, Chi cuadrado (X^2), Test de Fisher, Prueba de Sensibilidad, Prueba de Especificidad, Valor predictivo positivo, Valor predictivo negativo, razón de verosimilitud o Likelihood Ratio (LK). El nivel de confianza adoptado fue del 95%, con un error $\alpha < 0.05$.

Para evaluar la distribución estacional de los diferentes estatus uterinos y la condición corporal, se utilizó la prueba Chi cuadrado (X^2) de contingencia y el Test de Fisher para comparar grupos.

5.7.1 Técnicas estadísticas aplicadas en los resultados de los ensayos en muestras sin solubilizar

Se realizó un análisis estadístico descriptivo, se estimó la media y el desvío estándar (DE). Para la evaluación de las variables en muestras de distintos grupos se utilizó ANOVA y t-test no pareado. Para Comparar las mismas variables determinadas con distintos métodos se utilizó la prueba t-test de muestras pareadas. Para el análisis de la prueba de esterasa leucocitaria y fondo de extendido (limpio-sucio) como prueba diagnóstica para ES, se aplicó la prueba de sensibilidad, especificidad, VPP, VPN, LK.

5.7.2 Técnicas estadísticas aplicadas en el análisis del desarrollo del protocolo de homogeneización del mucus

Para la descripción de las variables en estudio se utilizó un análisis estadístico de tipo descriptivo, se estimó la media y el desvío estándar. Para evaluar los efectos de la adición del detergente sobre las muestras se utilizó el t-test pareado.

5.7.3 Técnicas estadísticas aplicadas en el análisis de muestras solubilizadas

Para la descripción de las variables en estudio se utilizó un análisis estadístico de tipo descriptivo, se estimó la media y el desvío estándar. Para validar la técnica de determinación de sólidos totales a partir del índice de refracción se aplicaron las siguientes pruebas estadísticas: descriptiva, t- test para comparar datos entre dos grupos, ANOVA para comparar los datos entre tres grupos, análisis de correlación y análisis de regresión lineal.

5.7.4 Análisis multivariado

Se utilizó el programa estadístico R. Se tomaron todas las variables en estudio y se aplicó la prueba de correlación obteniendo una matriz de correlación de los datos. Posteriormente se realizó el test de componentes principales. Con los componentes principales obtenidos se modelizó la información para realizar la prueba de árboles de clasificación.

El análisis de componentes principales se aplicó para reducir la dimensión del espacio original de las variables y la interpretación de la información. El supuesto que subyace en esta técnica es que, la variabilidad del conjunto de datos es informativa. Por lo cual, la cantidad de variables con las que se está trabajando se puede reducir encontrando un conjunto de nuevas variables construidas como combinación lineal de las variables originales; con el objetivo de que este nuevo conjunto de variables capture la mayor variabilidad posible. A estas combinaciones lineales de variables se las denominó Componentes Principales (CP).

Los árboles de clasificación se emplearon para asignar unidades experimentales a clases de una variable dependiente a partir de sus mediciones en uno o más predictores. En este caso se utilizó para asignar el estatus sanitario uterino a un animal a partir de la información obtenida del examen del MCV y CB.

El árbol se generó mediante un algoritmo, en el cual cada rama representa las decisiones y cada una de ellas genera reglas que permite continuar la clasificación, formando grupos homogéneos respecto a la variable respuesta (estatus sanitario uterino), permitiendo clasificar nuevos animales.

6 RESULTADOS

6.1 Prevalencia de endometritis

La prevalencia de vacas con endometritis y vacas con estatus sanitario uterino sano obtenida desde el 2017 al 2021 en establecimientos de la provincia de Santa Fe, Argentina, se describe en la Tabla 3.

La prevalencia de ES en animales que presentaban flujo 0, con un estatus sanitario uterino aparentemente sano (n=106) fue 35% (n=37).

Del total de hembras muestreadas (n=146) el 53% presentó algún tipo de endometritis (ES - EC) en el periodo del postparto en estudio (21 - 56 días).

Tabla 3. Prevalencia de vacas con estatus sanitario uterino sano, endometritis subclínica y endometritis clínica, en Santa Fe, Argentina. Periodo 2017-2021

Estatus sanitario uterino	Sanas	Endometritis subclínica	Endometritis clínica	TOTAL
N° de vacas	69	37	40	146
Porcentaje (%)	47%	25%	28%	100%

Valores de Prevalencia (%) de vacas con estatus sanitario uterino S, ES y EC en establecimientos lecheros de la Provincia de Santa Fe, Argentina. Periodo 2017-2021.

Al analizar la prevalencia según los días en leche, se encontró que en la 3 - 5 semana postparto, la prevalencia fue del 52% de hembras con estatus sanitario uterino sano, 24% ES y 24% EC. En el segundo periodo estudiado de la 5 - 7 semana se obtuvo una prevalencia de 48% sanas, 17% ES y 35% EC. Luego de las 7 semanas: 35% sanas, 38% ES y 27% EC (Tabla 4). La prevalencia de ES en animales que sólo presentaban flujo tipo 0, con un estatus sanitario uterino aparentemente sano fue en la 3 - 5 semana del 69%

de sanas y 31% ES, en 5 - 7 semana 74% sanas y 16% ES y posterior a la 7 semana 48% sanas y 52% ES.

Tabla 4. Prevalencia de vacas con estatus sanitario uterino sano, endometritis subclínica y endometritis clínica, según semana de muestreo, en Santa Fe, Argentina. Periodo 2017-2021

SEMANAS POSTPARTO	Sanas	ES	EC
3-5	52%	24%	24%
5-7	48%	17%	35%
+ 7	35%	38%	27%

Valores de Prevalencia (%) de vacas con estatus sanitario uterino S, ES y EC en establecimientos lecheros de la Prov. De Santa Fe, Argentina. Evaluado según semanas postparto. Periodo 2017-2021.

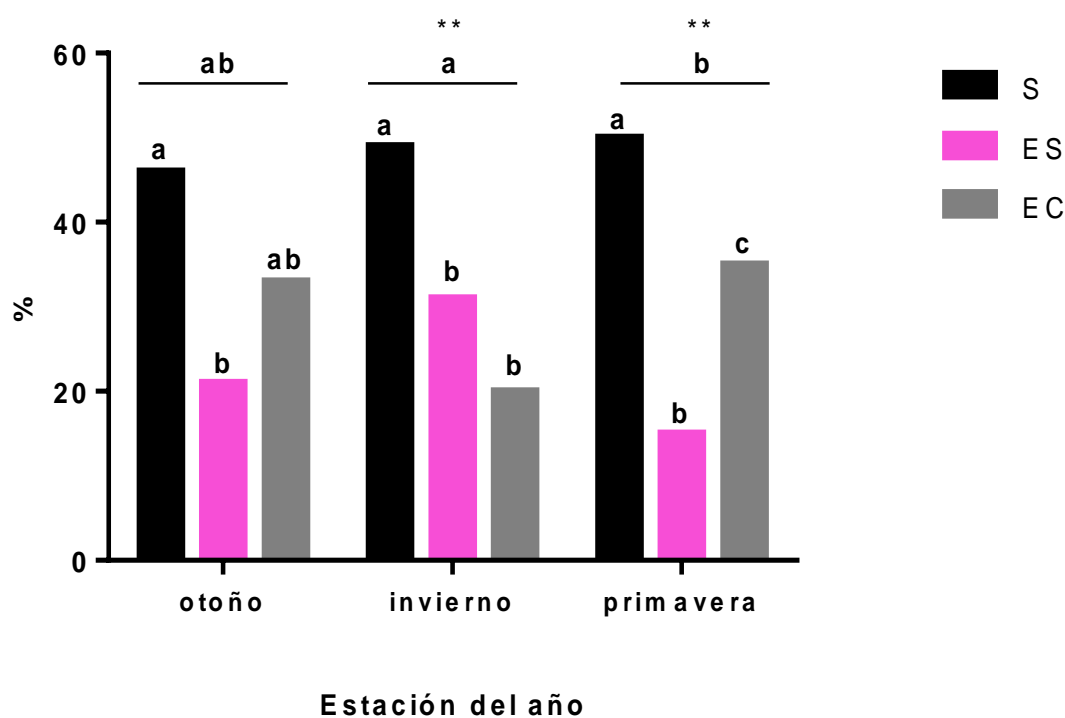
6.1.1 Variación estacional de la prevalencia

Cuando se correlacionó la distribución de la prevalencia por estación climática de vacas con estatus sanitario uterino sano, con endometritis subclínica y con endometritis clínica se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) (Gráfico 1). En la estación otoño del total de hembras muestreadas el 33% presentó EC, el 21% ES y el 46% fue S. En la estación invierno el 20% presentó EC, el 31% ES y el 49% estatus sanitario uterino sano. En la estación primavera el 35% presentó EC, el 15% ES y el 50% estatus sanitario uterino S. La estación verano no se tomó en este estudio, ya que la mayoría de los partos ocurren en otoño, invierno y primavera en Argentina por cuestiones de manejo del rodeo.

El menor porcentaje de endometritis subclínica (15%) se asoció con la estación primavera. Se encontraron diferencias entre el comportamiento de la estación invierno y primavera ($p=0.008$).

Tomando en cuenta el total de animales con endometritis (EC y ES) la estación otoño presentó mayor porcentaje (54%), luego el invierno (51%) y el menor porcentaje lo presentó la primavera (50%).

Gráfico 1. Distribución según estación del año del estatus sanitario uterino de vacas lecheras Holando Argentino, en establecimientos de la provincia de Santa Fe, Argentina. Periodo 2017-2021

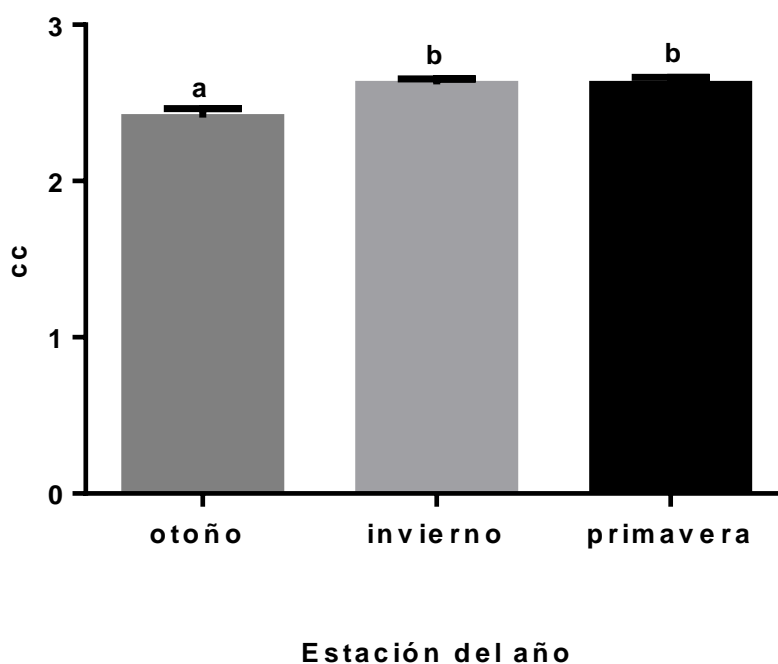


Prevalencia según estatus sanitario uterino (S, ES y EC) de hembras bovinas lecheras, de la cuenca de Santa Fe, en las estaciones; otoño, primavera e invierno (S=69, EC=38, ES=35). Periodo 2017-2021. ^{a,b,c} Letras diferentes asignadas en cada estatus sanitario uterino según estación del año y entre estaciones, indican diferencias estadísticas significativas entre los grupos ($p<0.05$).

6.1.2 Variación estacional de la condición corporal

Para correlacionar si las variaciones observadas en las distintas estaciones se correspondían a cambios en la condición corporal, se realizó un análisis del mismo. Se encontraron diferencias significativas en la CC de los grupos en estudio en las diferentes estaciones ($p=0.007$) (Gráfico 2). La condición corporal obtenida en promedio en primavera ($n=45$) fue 2.7 ± 0.2 , en invierno 2.6 ± 0.3 ($n=76$) y 2.4 ± 0.3 en otoño ($n=24$). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de CC de otoño y primavera ($p=0.006$) y otoño vs invierno ($p=0.003$).

Gráfico 2. Condición corporal de vacas lecheras Holando Argentino en el periodo postparto según estación del año, provincia de Santa Fe, Argentina. Periodo 2017-2021



Condición corporal de hembras bovinas ($n=145$) por estación en la cuenca lechera de Santa Fe, en el periodo 2017-2021. ^{a, b} Letras diferentes asignadas en cada columna indican diferencias estadísticas significativas en la CC ($p<0.05$).

6.2 Ensayos realizados en muestras sin solubilizar

Se analizaron las siguientes variables en muestras de moco sin procesar; tipo de flujo, evaluación de extendido de MCV fresco al microscopio óptico, pH y tiras reactivas de orina para observar si existen diferencias entre los grupos.

6.2.1 Evaluación del MCV

6.2.1.1 Tipo de MCV y relación con el estatus sanitario uterino

Se recolectaron 146 muestras de moco cérvico-vaginal, de los cuales el 73% de las muestras (n=106) de MCV se clasificaron como flujo tipo 0 y el 27% (n=40) como muestras de flujo de tipo purulento. De las muestras de MCV de flujo tipo cero el 83% fue transparente (n=88) y el 17% presentó turbidez (n=18). Del flujo transparente el 66% (n= 58) fue de hembras sanas y el 34% (n=30) de hembras con ES. Del flujo turbio el 61% (n=11) correspondió a muestras de MCV de hembras sanas y el 39% (n=7) de hembras con ES. De los flujos purulentos obtenidos (n=40) el 67% fue de tipo P1 (n=27), 33% tipo P2 (n=13).

No se encontró asociación entre el tipo de flujo transparente o turbio con el estatus sanitario uterino S o ES ($p>0.05$).

6.2.1.2 Evaluación del MCV al Microscopio óptico:

6.2.1.2.1 Lectura de fondo de extendido y tipo de flujo en grupos experimentales

La lectura de FE, en los extendido de MCV se realizó para determinar si se encontraba alguna diferencia en los grupos en estudio, que asocie la

presencia de células basales, detritus y células inflamatorias observadas en los preparados de MCV o flujo con el estatus sanitario uterino del animal.

Grupo Sano (n=40): el 85% (n=34) de los fondos de los extendidos de MCV resultaron de tipo limpio y 15% (n=6) tipo sucio (Figura 19 y 20). El 97% de las muestras de MCV tipo L se obtuvieron de un flujo de tipo transparente (n=33) y el 3% (n=1) de flujo turbio. El 34% de las muestras de tipo Su (n=2) se obtuvieron de flujo transparente y el 66% de flujo turbio (n=4) (Tabla 5).

Grupo Endometritis subclínica (n=26): 42% (n=11) de los fondos de los extendidos resultaron de tipo L y 58% (n=15) tipo Su (Figura 19 y 20). El 100% de las muestras de fondo limpio provenían de flujos transparentes (n=11). En cambio, de las muestras con fondo sucio el 53% provenía de flujo transparente (n=8) y el 47% de flujo turbio (n=7) (Tabla 5).

Grupo Endometritis clínica (n=27): se encontró 7% (n=2) de los fondos tipo L y 93% (n=25) tipo Su. De las muestras que presentaron fondo tipo L, el 100% provenía de un flujo tipo 1 (n=2). En las muestras con fondo tipo Su el 60% (n=15) provenía de un flujo tipo 1, el 40% de un flujo tipo 2 (n=10) (Tabla 5).

Al comparar los resultados de FE de grupos sanos, ES y EC mediante el test X^2 se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.0001$). Al aplicar el test de Fisher se encontraron diferencias entre el grupo sano y ES ($p < 0.0001$), sano y EC ($p < 0.0001$) y EC vs ES ($p < 0.0001$).

Tabla 5. Relación entre el tipo de moco obtenido y el fondo de extendido

	FONDO LIMPIO			FONDO SUCIO		
	S	ES	EC	S	ES	EC
Distribución general	34 (85%)	11(42%)	2 (7%)	6 (15%)	15 (58%)	25 (93%)
MCV Transparente	33 (97%)	11 (100%)	0 (0%)	2 (34%)	8 (53%)	0 (0%)
MCV Turbio	1 (3%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (66%)	7 (47%)	0 (0%)
MCV Tipo 1	0 (0%)	0 (0%)	2(100%)	0 (0%)	0 (0%)	15 (60%)
MCV Tipo 2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	10 (40%)

Lectura de FE de MCV de hembras del Grupo S, ES y EC. Relación entre el tipo de moco obtenido y el fondo del preparado.

Como se puede visualizar en las Figuras 19 y 20 se observaron cristales de diferentes tipos (típicos y atípicos), el fondo limpio se observó al microscopio óptico como un fondo claro y el fondo sucio presentó un puntillado característico y presencia de material celular compatible con células inflamatorias y basales, las cuales se confirmaron luego de realizar la tinción con Hematoxilina-Eosina (H-E).

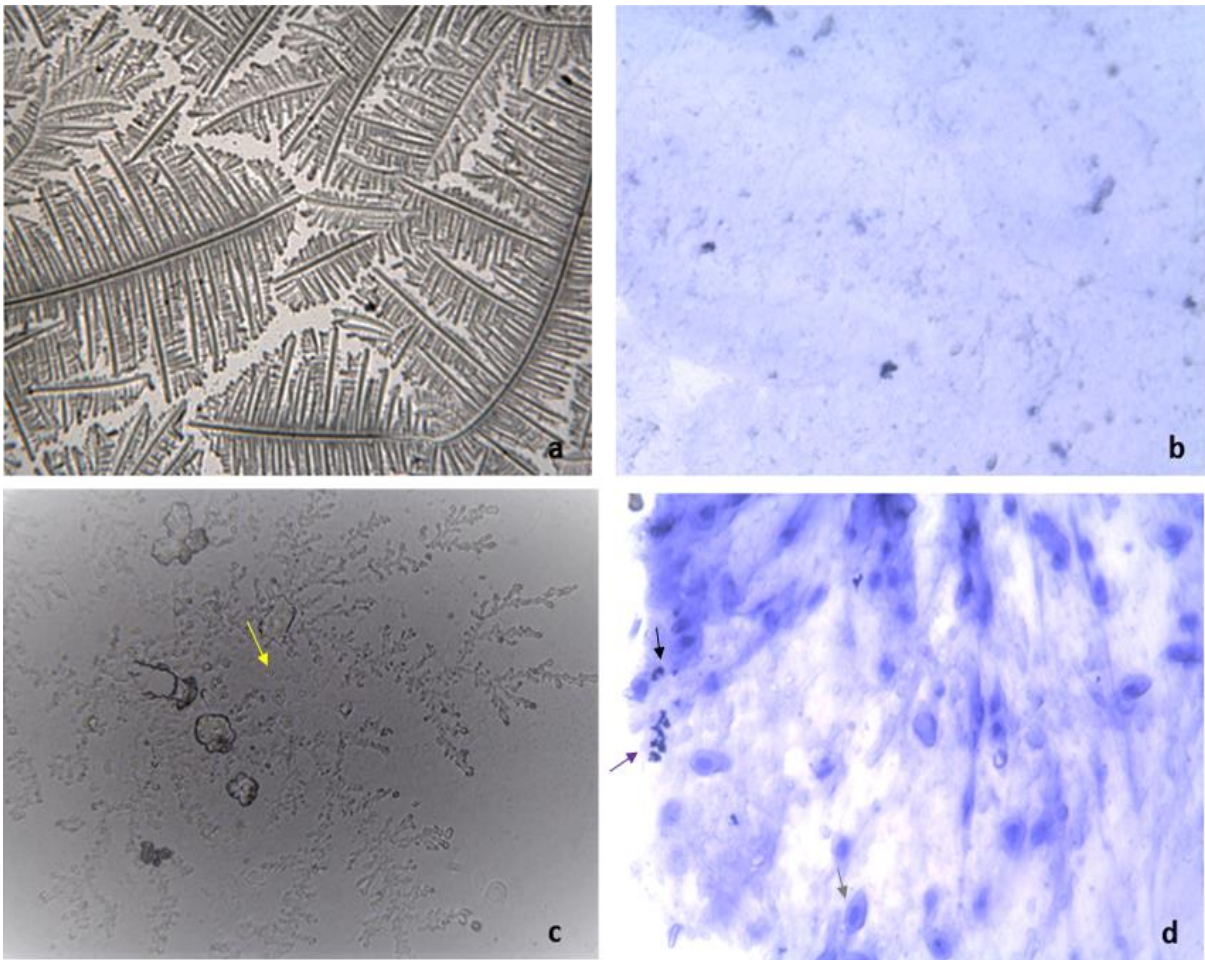


Figura 19. Imagen de extendido de MCV. Extendido de gota de moco con fondo limpio (a) 100X. Extendido con fondo sucio (c), en el cual se observa un puntillado en el fondo (flecha amarilla) 100X. Tinción con H-E con fondo limpio (b) y de extendido con fondo sucio (d), en el cual se visualizan células (flecha gris), PMN N (flecha negra) y detritus (flecha violeta). Magnificación 400X. El preparado de fondo limpio corresponde a una hembra bovina con estatus sanitario uterino sano (a y b) y el preparado de fondo sucio a MCV de una hembra con endometritis subclínica (c y d).

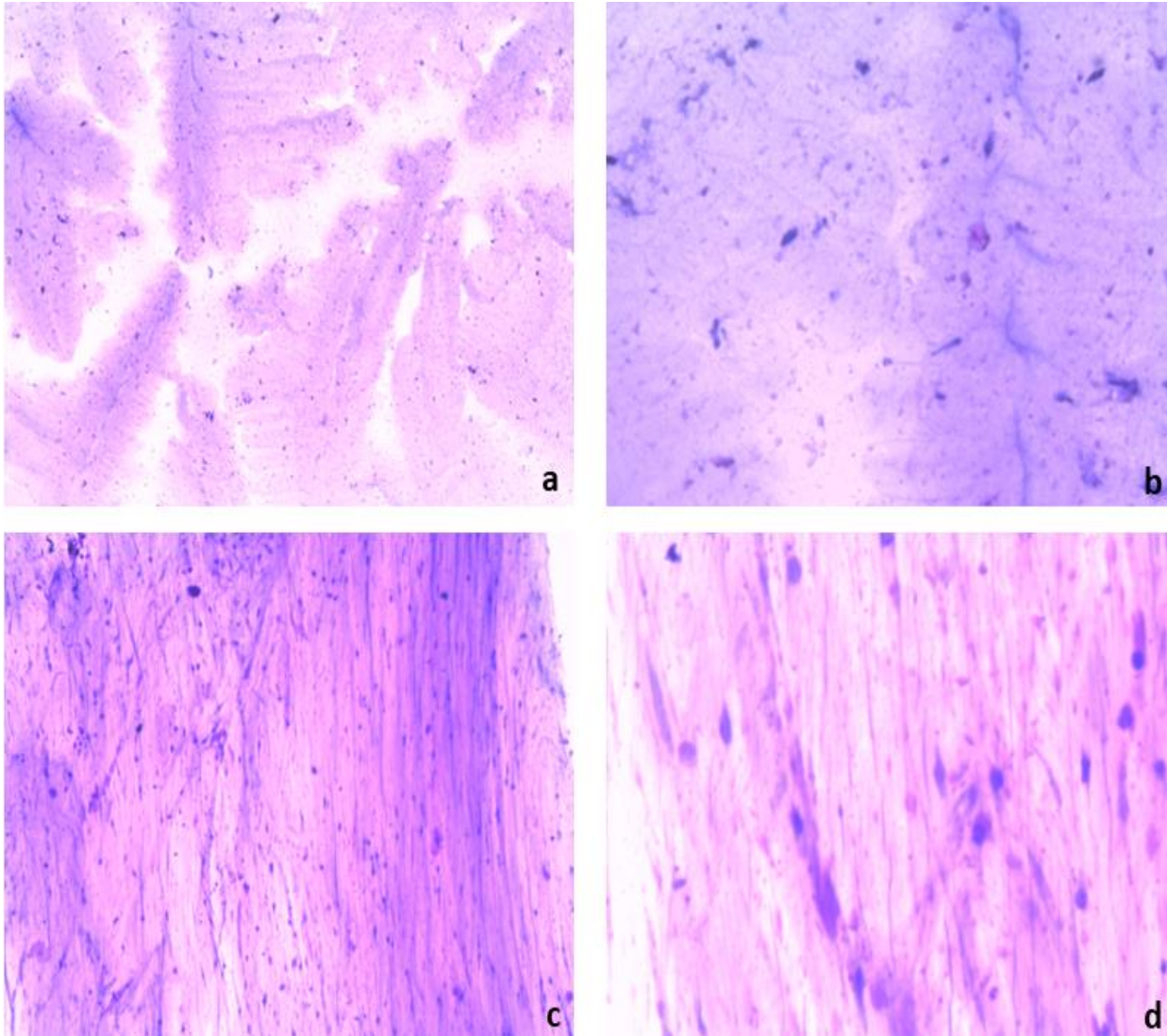


Figura 20. Imagen de extendido de MCV con tinción H-E. Lectura fondo limpio (a) 100X, los cristales no se identifican luego del procesamiento histológico, pero se tiñen sus componentes estructurales. Extendido con fondo sucio (c) 100X. Extendido con fondo limpio (b), en el cual se observan a 400X estructuras que conforman los cristales teñidos con coloración basófila y eosinófila. Extendido de fondo sucio (d) 400X, en el cual se visualizan células, PMN N y detritus.

6.2.1.2.2 Evaluación de la lectura según tipo de flujo 0

Se analizó el tipo de flujo obtenido con la lectura de FE, para determinar si existe asociación entre ellos.

En las muestras con flujos tipo 0 (n=45) el 96% pertenecía a muestras de MCV transparente y solo el 4% a muestras con flujo turbio. En el caso de los preparados con fondo sucio de 21 muestras el 52% provenía de flujo turbio y 48% de flujo transparente (Tabla 6).

Tabla 6. Lectura de extendidos de flujo tipo 0 en muestras de MCV transparentes y turbias

Flujo tipo 0		
	Fondo limpio	Fondo sucio
Distribución general	45 (68%)	21 (32%)
MCV Transparente	43 (96%)	11 (52%)
MCV Turbio	2 (4%)	10 (48%)

Resultado de la lectura de extendidos de MCV de muestras con flujo tipo 0. Relación entre el tipo de moco obtenido (transparente o turbio) y el fondo del preparado.

Se encontraron diferencias significativas entre el FE en el flujo tipo 0, al comparar flujos transparentes y turbios ($p < 0.0001$), ya que el flujo transparente se relacionó en mayor proporción al fondo limpio y el flujo turbio se relacionó en mayor proporción a un fondo sucio.

6.2.1.2.3 Análisis de la técnica de lectura de fondo de extendido para el diagnóstico de ES y EC

Para determinar si el análisis del fondo de extendido de MCV es de utilidad para el diagnóstico de endometritis se aplicó el test de sensibilidad y especificidad.

En muestras de MCV de vacas con ES se encontró; una sensibilidad de la técnica del 58% (IC 95%, 48% a 68%), especificidad 85% (IC 95%, 76% a 91%), valor predictivo positivo 79% (IC 95%, 48% a 86%), valor predictivo negativo 66% (IC 95%, 54% a 71%) y Likelihood Ratio (LR+) 3.86 (regular) para la prueba de la lectura del fondo de extendido (Tabla 7).

Para la EC se encontró una sensibilidad de la técnica del 93% (IC 95%, 86% a 97%), especificidad 85% (IC 95%, 76% a 91%), valor predictivo positivo 86 % (IC 95%, 78% a 92%), valor predictivo negativo 92% (IC 95%, 84% a 96%) y Likelihood Ratio (LR +) 6.2 (buena) (Tabla 7).

Tabla 7. Análisis de Se, Esp, VPP, VPN, LR para la prueba de lectura de fondo de extendido como técnica diagnóstica en hembras con ES y EC.

	Se	Esp	VPP	VPN	LR
ES	58%	85%	79%	66%	3.86
EC	93%	85%	86%	92%	6.2

Análisis de la sensibilidad (Se), especificidad (Esp), valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) y Likelihood Ratio (LR) de la técnica de lectura de fondo de extendido para muestras de MCV de vacas con ES (n=26) y con EC (n=27).

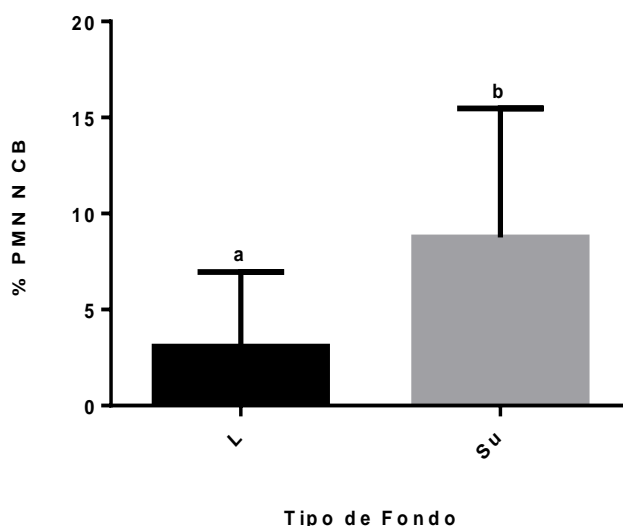
6.2.1.2.4 Relación entre el fondo de extendido de MCV y porcentaje de polimorfonucleares neutrófilos en cytobrush

Debido a que los PMN N son células inflamatorias que aumentan en casos de endometritis se analizó la relación entre la presencia de PMN N obtenidos en el *cytobrush* y la lectura de FE.

Los extendidos de tipo limpio (n=38) presentaron 1.75 ± 1.76 % PMN en las citologías endometriales, tomando valores mínimos de 0% y máximo de 6%, mediana 1.5%. Los extendido de tipo sucio (n=21) presentaron 8.76 ± 6.7 % PMN en las citologías endometriales, tomando valores mínimos de 0.5% y máximos de 23%, mediana 7.5%.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar el % PMN N en muestra de moco con fondo limpio y con fondo sucio ($p < 0.0001$) (Gráfico 3).

Gráfico 3. Relación entre la lectura del fondo de extendido de MCV y el porcentaje de polimorfonucleares neutrófilos en *cytobrush*



Relación entre el FE de moco limpio (L) y sucio (Su), con el porcentaje de PMN N encontrados en las muestras de citología endometrial (CB). ^{a, b} Letras diferentes indican diferencias significativas en el % PMN N entre los grupos.

6.2.2 Determinación de pH

Se realizó la medición del pH de las muestras de MCV, en fase folicular y lútea para evaluar si existían diferencias de valores entre los grupos experimentales.

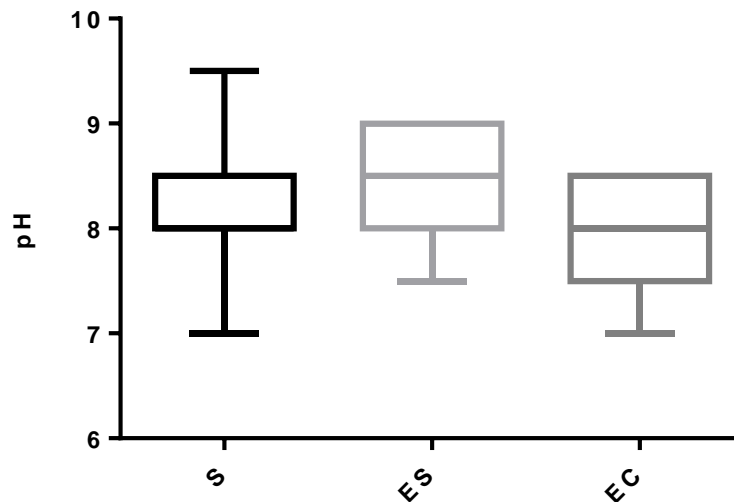
Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p=0.002$) (Tabla 8). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar las muestras de ES y S ($p=0.03$) y EC vs ES ($p=0.007$). No hay diferencias estadísticamente significativas entre S y EC ($p=0.20$) (Gráfico 4).

Al comparar los valores de pH en muestras de MCV entre los grupos en la fase folicular, se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 8), entre los valores obtenidos de las muestras del grupo S y ES ($p=0.02$), así como al comparar ES con EC ($p=0.002$). No se encontraron entre EC y S ($p=0.2$). En la fase lútea, el valor promedio de pH del MCV para el grupo sano fue 8.3 ± 0.6 , para el grupo ES 8.3 ± 0.4 y 8 ± 0.5 para el grupo EC. No se encontraron diferencias en los valores de pH entre los grupos en esta fase ($p=0.29$).

Tabla 8. Determinación de pH en MCV de grupos experimentales

pH	S	ES	EC
Media y DE	8.2 ± 0.6^a	8.5 ± 0.5^b	7.9 ± 0.6^a
Valor mínimo	7.0	7.5	7.0
Valor máximo	9.5	8.5	8.5

Valores de pH media \pm desvío estándar (DE), valores máximos y mínimos según estatus sanitario uterino; sano (S) ($n=37$), con endometritis subclínica (ES) ($n=25$), con endometritis clínica (EC) ($n=33$). ^{a, b} Letras diferentes asignadas en cada fila indican diferencias estadísticas significativas de valores de pH entre los grupos ($p<0.05$).

Gráfico 4. Valores de pH de muestras de MCV de grupos experimentales**Gráfico 4.** Valores de pH de muestras de moco cérvico-vaginal de vacas sanas (S) (n=37), con endometritis subclínica (ES) (n=25) y clínica (EC) (N=33).**Tabla 9.** Determinación de pH en muestras de MCV en fase folicular de vacas con estatus sanitario uterino sano, con endometritis subclínica y endometritis clínica.

pH	S	ES	EC
Media y DE	8.2 ± 0.5 ^a	8.7 ± 0.3 ^b	7.9 ± 0.6 ^a
Valor mínimo	7.0	8.5	7.0
Mediana	8.2	8.5	8
Valor máximo	9.0	9.0	8.5

Valores de pH media ± DE; valores máximos, mínimos y mediana de muestras de MCV en fase folicular en grupo sano (S) (n=16), con endometritis subclínica (ES) (n=8) y con endometritis clínica (EC) (n=14). ^{a, b} Letras diferentes asignadas en cada fila indican diferencias estadísticas significativas de valores de pH entre los grupos (p<0.05).

6.2.3 Utilización de Tiras reactivas

Se evaluó la utilización de tiras reactivas en muestras de MCV, para las siguientes determinaciones: pH, proteínas, esterasa leucocitaria, glucosa, cuerpos cetónicos, y urobilinógeno.

6.2.3.1 Comparación entre los resultados de pH medidos por las tiras reactivas de referencia y las tiras reactivas de orina

Cuando se compararon valores de pH medidos por tiras reactivas de referencia (PHI-14 TEST PAPER®) y tiras reactivas de orina Urine Strip Wiener lab® no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos ($p=0.48$). Se utilizaron para este ensayo las muestras de MCV de los tres grupos experimentales ($n=29$).

6.2.3.2 Comparación entre los resultados de proteínas determinados por el método de Ácido Bicinconínico y las tiras reactivas de orina

Al comparar los valores los valores obtenidos por el método de referencia de Ácido Bicinconínico y las tiras reactivas de orina Urine Strip Wiener lab® se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p<0.0001$) ($n=29$).

6.2.3.3 Glucosa, cuerpos cetónicos, urobilinógeno

En las muestras de MCV de los tres grupos en estudio (S, ES y EC) se obtuvo como resultado: glucosa (-), cuerpos cetónicos (-), urobilinógeno normal (0.1 mg/dl). En este trabajo no se han medido las variables anteriormente mencionadas por otros métodos de referencia, por lo cual se informa solo el resultado obtenido por la lectura de la tira reactiva.

6.2.3.4 Prueba de Esterasa Leucocitaria

La prueba de esterasa leucocitaria permite detectar la presencia de células inflamatorias en las muestras, por lo cual se utilizó para evaluar el grado de inflamación en muestras de MCV.

En los ensayos en el grupo sano (n=38), el 95% (n=36) de las muestras de MCV resultaron en lectura negativa a la prueba de la esterasa y el 5% (n=2) de las muestras en lectura positiva (50% valor 1 y 50% valor 2). En el grupo ES (n=22): el 86% (n=19) de las lecturas resultaron positivas a la prueba de la esterasa, presentando un rango entre 0.5 (10 leu/ul) (69%) y 1 (25 leu/ul) (26%) y 2 (72 leu/ul) (5%). El 14% de las lecturas fueron negativas (n=3). En las muestras de MCV de vacas con endometritis clínica (n=24) el 96% (n=23) resultó con lectura positiva a la prueba de la esterasa, presentando rangos entre 1 (30%), 2 (35%) y 3 (35%), el 4% de las muestras sometidas al ensayo arrojaron resultado negativo (n=1). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en estudio ($p < 0.0001$) y al comparar resultados de LE en MCV de vacas S y ES ($p < 0.0001$).

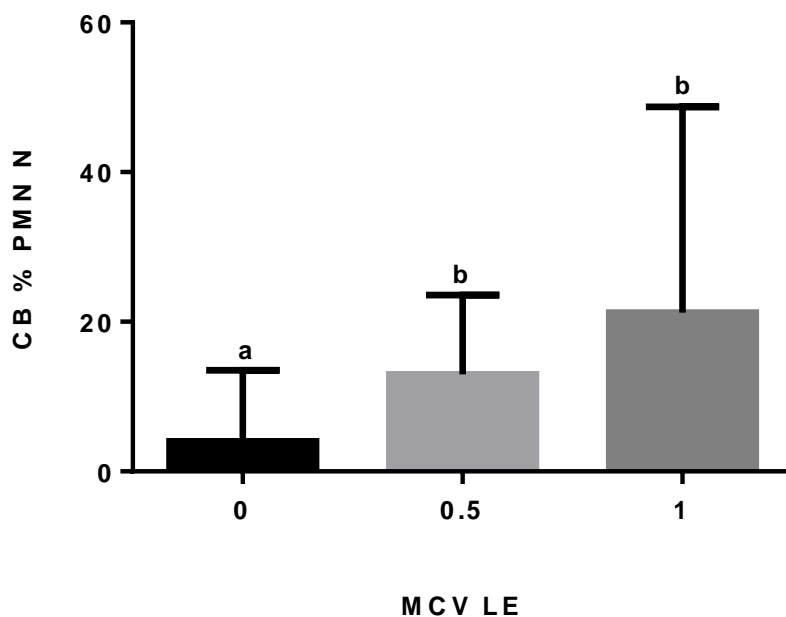
No se encontraron diferencias ($p = 0.53$) al comparar mediante la prueba t-test pareada las lecturas de leucocitos en muestras de MCV frescas y muestras tratadas con el protocolo de homogeneización.

El porcentaje de PMN N obtenido por la lectura de CB se modificó según la actividad de la tira LE ya que se encontraron diferencias entre el rango 0 con los rangos 0.5 y 1 ($p < 0.0001$) (Gráfico 5).

El test de esterasa leucocitaria arrojó para el diagnóstico de ES, sensibilidad 86% (IC 95%, 65% a 97%), especificidad 95% (IC 95%, 82% a 99%), valor predictivo positivo 90% (IC 95%, 70% a 99%), valor predictivo negativo 92% (IC 95%, 79% a 98%). Likelihood Ratio (LR) o razón de verosimilitud; (LR+) 16.41, (LR-) 0.08 (utilidad altamente relevante) (Tabla 10).

Para EC; Se 96% (IC 95%, 79% a 99%), Esp 94% (IC 95%, 82% a 99%), VPP 92% (IC 95%, 74% a 99%), VPN 97% (IC 95%, 86% a 99%), LK (LR+) 18.21, (LR-) 0.04 (utilidad altamente relevante) (Tabla 10).

Gráfico 5. Relación entre la actividad esterasa leucocitaria en muestras de MCV y el porcentaje de polimorfonucleares neutrófilos en cytobrush



Relación entre actividad de LE (0, 0.5 y 1) en MCV con el porcentaje de PMN N encontrados en las muestras de citología endometrial (CB). ^{a, b} Letras diferentes indican diferencias significativas en el % de PMN N entre los rangos.

Tabla 10. Análisis de Se, Esp, VPP, VPN, LR para la prueba de esterasa leucocitaria como técnica diagnóstica en hembras con ES y EC.

	Se	Esp	VPP	VPN	LR
ES	86 %	95%	90%	92%	16.41
EC	96%	94%	92%	97%	18.21

Análisis de la sensibilidad (Se), especificidad (Esp), valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) y Likelihood Ratio (LR) de la técnica de lectura de esterasa leucocitaria en muestras de MCV de vacas con ES (n=22) y con EC (n=24).

6.3 Desarrollo de un protocolo de homogeneización para muestras de MCV

Utilizando un detergente no iónico, se realizó la puesta a punto de un protocolo de procesamiento de MCV, con el objetivo de mejorar la manipulación de las muestras, evitando la formación de espuma y residuos sólidos al solubilizarlas.

6.3.1 Concentración mínima de Triton X-100® que homogeneiza las muestras MCV y no deja residuos después de la desecación completa

Todas las soluciones testeadas de Triton X-100® lograron la licuefacción del mucus, no obstante, solo la concentración final 0.01% (V/V) resultó en alta licuefacción, insignificante formación de espuma y residuos sólidos no detectables. Para su análisis se estableció una escala de valores, en la cual; - nada, + poco, ++ medio, +++ alto, ND: no detectable. Las otras tres concentraciones probadas de detergente produjeron una gran cantidad de espuma y dejaron residuos sólidos luego de la desecación completa (Tabla 11).

Tabla 11. Selección de la concentración óptima de Triton X-100® para el protocolo de solubilización de muestras de MCV

Triton X-100® concentración (V/V)	0.01%	0.5%	1%	3.3%
Licuefacción	+++	+++	+++	+++
Formación de espuma	+	+++	+++	+++
Residuos sólidos (g/dL)	ND	0.71 ± 0.30	3.8 ± 0.30	4.02 ± 0.03

Muestras de MCV de grupo control tratadas con diferentes concentraciones de detergente (n=8). Rango: - nada, + poco, ++ medio, +++ alto, ND: no detectable.

6.3.2 Efecto de la adición de Tritón X-100® sobre las propiedades fisicoquímicas del mucus

Además de lograr una correcta licuefacción, para validar el protocolo de homogeneización se requirió que el mismo no afecte los componentes de las muestras, por ello se determinó el IR y la concentración de ST, PT e iones en muestras sin procesar y procesadas.

6.3.2.1 Efecto de la adición de Triton X-100® sobre el índice de refracción

No se encontraron diferencias estadísticas en los valores de IR entre muestras procesadas con y sin detergente 0.01% (V/V) ($p=0.35$) (Tabla 12). Se halló alta concordancia ($p=0.19$) entre los valores de IR de muestras de MCV, medidas con el refractómetro digital y con el refractómetro de mano (Tabla 12).

6.3.2.2 Efecto de la adición de Triton X-100® sobre la concentración de sólidos totales, proteínas totales e iones

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en de ST ($p=0.70$), PT ($p=0.45$) e iones; Na^+ ($p=0.24$), K^+ ($p=0.32$), al comparar valores de muestras de MCV solubilizadas con y sin detergente (Tabla 12).

Tabla 12. Efecto de la adición de Triton X-100® 0.01% (V/V) en muestras de moco cérvico-vaginal

	ST (g/dL)	Na (meq/L)	K ⁺ (meq/L)	PT (g/dL)	IR Refractómetro manual	IR Refractómetro digital
MCV + agua destilada	1.60 ± 0.90 ^a	113 ± 17 ^a	13 ± 2 ^a	1.01 ± 0.69 ^a	1.3360 ±0.0013 ^a	1.3350 ±0.0009 ^a
MCV + Triton X-100® 0.01% (V/V)	1.62 ± 0.97 ^a	103 ± 25 ^a	12 ± 4 ^a	1.10 ± 0.84 ^a	1.3360 ±0.0016 ^a	1.3360 ± 0.0008 ^a

ST (g/dL), Na^+ (meq/L), K^+ (meq/L), PT (g/dL), IR (determinado con refractómetro digital y manual). Valores de muestras del grupo control tratadas con agua y con Triton X-100® 0.01% (V/V). Los valores son expresados en media ± DE (n=15). ^{a, b} Letras

diferentes asignadas en cada columna indican diferencias estadísticas significativas en las determinaciones entre tratamientos ($p < 0.05$).

6.4 Ensayos realizados en muestras homogeneizadas

Luego de validar el protocolo de homogeneización y elegir la concentración de detergente no iónico que redujo la formación de espuma, permitió la correcta manipulación de pequeños volúmenes de muestra y no alteró los valores de las determinaciones requeridas en MCV, se procedió a realizar las pruebas bioquímicas en muestras homogeneizadas para cada grupo experimental detalladas a continuación.

6.4.1 Determinación de sólidos totales

Los sólidos totales se componen por sustancias orgánicas e inorgánicas (proteínas, úrea, glucosa, lípidos, electrolitos). Son solutos que se obtienen luego de desecación completa de la muestra.

La concentración de ST en MCV de vacas sanas ($n=47$) obtenida fue 1.76 ± 0.51 g/dL, en vacas ES ($n=33$) 1.75 ± 0.88 g/dL y en MCV del grupo EC ($n=30$) 2.87 ± 1.28 g/dL. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p < 0.0001$), así como al comparar las muestras de EC y ES ($p=0.0001$), S y EC ($p < 0.0001$). No se encontraron diferencias entre los grupos ES y S ($p=0.48$) (Tabla 13).

Se encontraron diferencias significativas al comparar la concentración de ST en la fase folicular en los grupos S y EC ($p=0.001$), ES y EC ($p=0.003$) y en la fase lútea; S y EC ($p=0.004$), ES y EC ($p=0.025$). No se encontraron diferencias entre los grupos ES y S ($p > 0.05$) (Tabla 13).

Tabla 13. Concentración de sólidos totales (g/dL) en muestras de MCV en fase folicular y lútea de los grupos con estatus sanitario uterino sano, con endometritis subclínica y endometritis clínica

ST (g/dL)	S	ES	EC
GRUPO	1.76 ± 0.51 ^a	1.75 ± 0.88 ^a	2.87 ± 1.28 ^b
FASE FOLICULAR	1.79 ± 0.64 ^a	1.47 ± 0.6 ^a	2.69 ± 0.92 ^b
FASE LÚTEA	1.87 ± 0.45 ^a	2 ± 0.99 ^a	3.39 ± 1.78 ^b

Concentración de Sólidos Totales (g/dL) (media ± DE) en muestras de moco cérvico-vaginal de vacas con estatus sanitario uterino sano (n=47) en FF (n=20) y FL (n=14), vacas ES (n=33) en FF (n=8) y FL (n=14) y vacas EC (n=30) en FF (n=15) y en FL (n=11). ^{a, b} Letras diferentes asignadas en cada fila indican diferencias estadísticas significativas en la concentración de sólidos totales (p<0.05).

6.4.1.1 Determinación de sólidos totales a partir del índice de refracción de las muestras

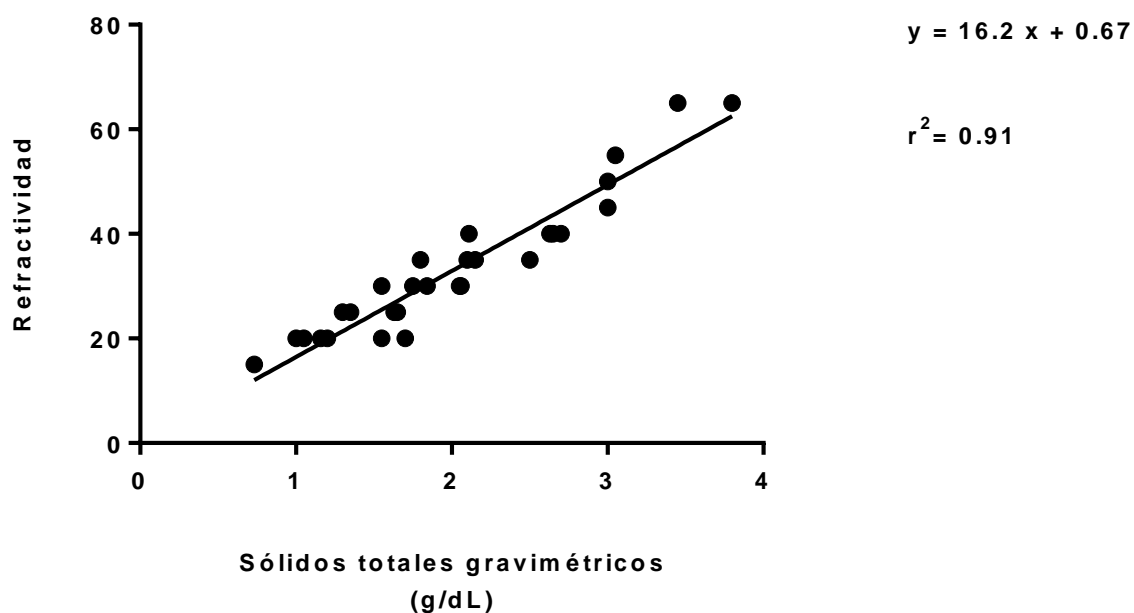
El método refractométrico es más fácil y rápido de aplicar para obtener la concentración de sólidos totales que el método gravimétrico, pero antes de su aplicación requiere la validación de la técnica para cada tipo de muestra.

A partir del análisis estadístico descriptivo aplicado se obtuvo en el grupo control una concentración de sólidos totales en muestras de MCV de 1.99 ± 0.77 (g/dL) y un valor de refractividad promedio de 33 ± 13.

Al realizar el match entre los valores de gTs y refractividad se obtuvo una regresión lineal, con un coeficiente de regresión (r^2) = 0.91 y pendiente 16.2 (Gráfico 6).

La ecuación matemática resultante fue: **cTS (g/dL) = (R - 0.67) / 16.2**

Gráfico 6. Regresión lineal entre sólidos totales gravimétricos (gTs) (g/dL) y valores de refractividad de muestras de MCV del grupo control



6.4.1.2 Determinación de cTS en los grupos con endometritis

No se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los valores de cTS y gTS en los grupos ES ($p=0.07$) y EC ($p=0.18$). Se obtuvo una correlación positiva alta ($r=0.97$) entre los valores de sólidos totales calculados mediante la ecuación obtenida en el punto anterior y los valores de sólidos totales determinados mediante la técnica gravimétrica (Gráficos 7 y 8). Por lo cual estos resultados permiten validar la determinación de sólidos totales a partir de la técnica refractométrica.

Gráfico 7. Correlación entre los valores de sólidos totales gravimétricos (gTS) (g/dL) y sólidos totales calculados (cTS) (g/dL) de muestras de MCV del grupo endometritis subclínica

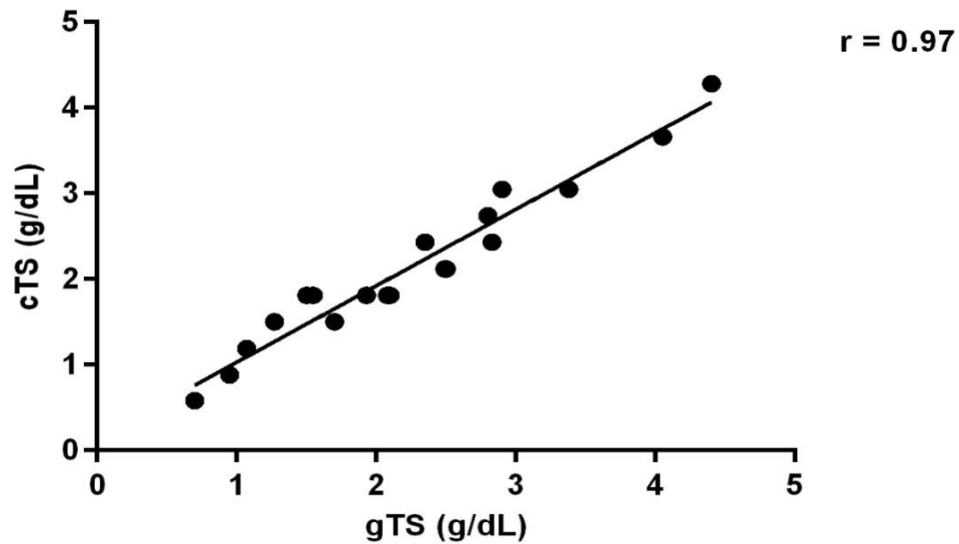
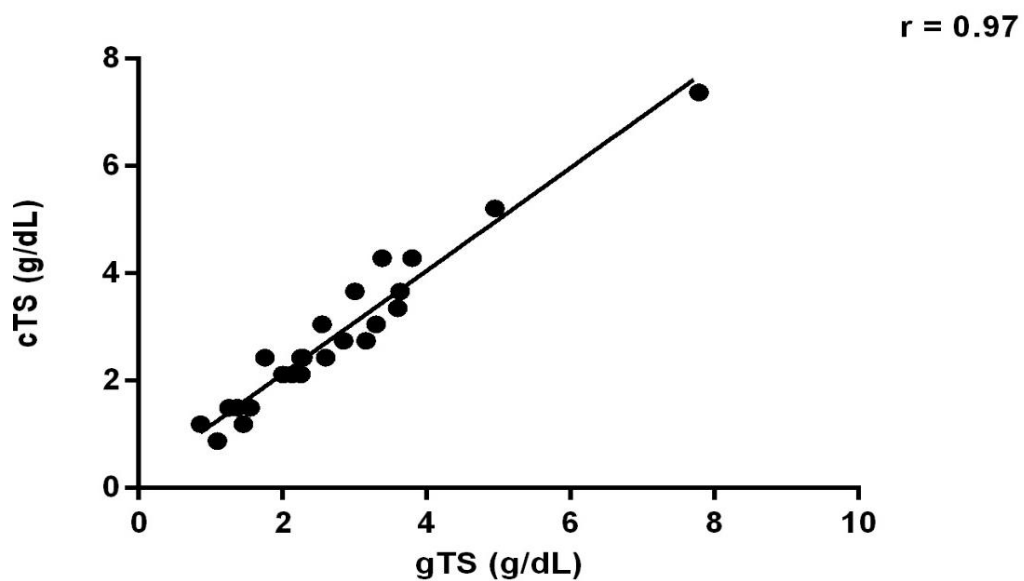


Gráfico 8. Correlación entre los valores de sólidos totales gravimétricos (gTS) (g/dL) y sólidos totales calculados (cTS) (g/dL) de muestras de MCV del grupo endometritis clínica



6.4.2 Determinación del porcentaje de agua

El mucus se encuentra conformado en su mayor proporción por agua, en este estudio se realizaron comparaciones del porcentaje de agua entre los grupos experimentales para determinar si la fluidez del mismo puede asociarse con el estado inflamatorio del útero.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los grupos en estudio ($p=0.001$). Existen diferencias entre el contenido de agua de las muestras de EC y ES ($p=0.016$), S y EC ($p=0.002$). No hay diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de MCV de grupos ES y S ($p=0.53$) (Tabla 14).

Se encontraron diferencias significativas al comparar el contenido de H₂O en la fase folicular en los grupos S y EC ($p=0.007$), ES y EC ($p=0.01$) y en la fase lútea; S y EC ($p=0.016$). No se encontraron diferencias entre las muestras de MCV de ES y S al compararlos en ambas fases ($p>0.05$) (Tabla 14).

Tabla 14. Porcentaje de agua en muestras de MCV de los grupos experimentales

Porcentaje de H ₂ O	S	ES	EC
GRUPO	98.1 ± 0.5 ^a	97.8 ± 0.9 ^a	97.1 ± 1.1 ^b
FASE FOLICULAR	98.13 ± 0.6 ^a	98.2 ± 0.6 ^a	97.3 ± 0.7 ^b
FASE LÚTEA	97.9 ± 0.6 ^a	97.8 ± 1 ^{ab}	96.3 ± 1.4 ^b

Contenido de agua (media ± DE) en muestras de MCV de vacas con estatus sanitario uterino sano ($n=26$) en FF ($n=15$) y FL ($n=9$), vacas ES ($n=18$) en FF ($n=8$) y FL ($n=9$), y vacas EC ($n=22$) en FF ($n=12$) y en FL ($n=7$). ^{a, b} Letras diferentes asignadas en cada fila indican diferencias estadísticas significativas en el porcentaje de agua de las muestras ($p<0.05$).

6.4.3 Determinación de la refractividad

La refractometría es una técnica utilizada rutinariamente en la clínica veterinaria para determinar el contenido de sólidos totales de muestras biológicas, en esta etapa experimental se evaluaron los valores de refractividad en vacas del grupo S, ES y EC, para establecer si existe alguna relación entre las variaciones de los valores de refractividad y la presencia de endometritis en la hembra.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p < 0.0001$). Existen diferencias en los valores de refractividad de las muestras de MCV de los grupos; EC y ES ($p = 0.001$), S y EC ($p < 0.0001$). No hay diferencias estadísticamente significativas al comparar los grupos ES y S ($p = 0.43$) (Tabla 15).

Se encontraron diferencias significativas en los valores de R en la fase folicular en los grupos S y EC ($p = 0.0001$), ES y EC ($p = 0.007$) y en la fase lútea; S y EC ($p = 0.0004$), ES y EC ($p = 0.001$). No se encontraron diferencia entre los grupos ES y S ($p > 0.05$) (Tabla 15).

Tabla 15. Valores de refractividad de muestras de MCV de los grupos experimentales

Refractividad	S	ES	EC
GRUPO	31.1 ± 10 ^a	33.5 ± 15 ^a	51 ± 23 ^b
FASE FOLICULAR	28.8 ± 9 ^a	29.5 ± 12 ^a	47 ± 16 ^b
FASE LÚTEA	34 ± 9 ^a	34 ± 15 ^a	62 ± 23 ^b

Refractividad en muestras de MCV (media ± DE) de vacas con estatus sanitario uterino sano (n=41) en FF (n=21) y FL (n=14), vacas ES (n=26) en FF (n=10) y FL (n=14), y vacas EC (n=39) en FF (n=15) y en FL (n=10). ^{a, b} Letras diferentes asignadas en cada fila indican diferencias estadísticas significativas en el % H₂O ($p < 0.05$).

6.4.4 Determinación de proteínas en MCV

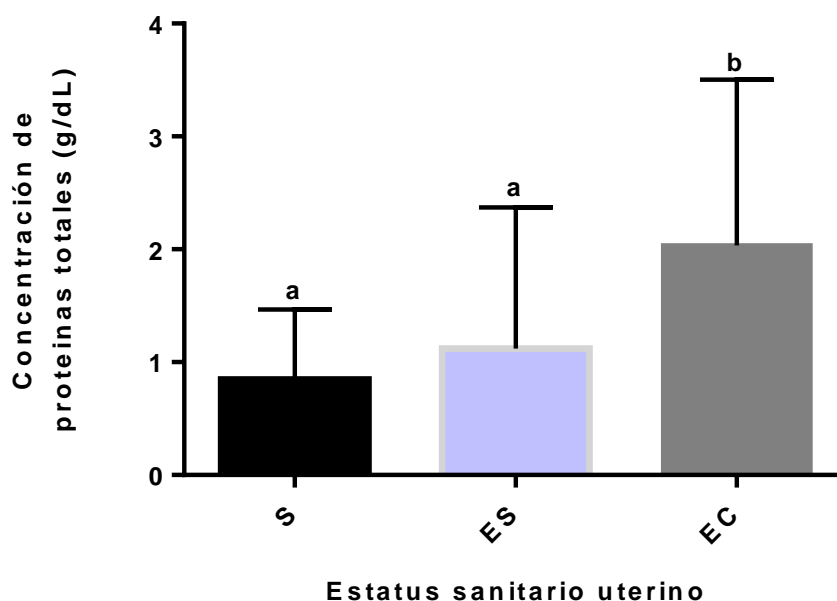
Debido a que la concentración de proteínas en sangre o fluidos, aumenta en casos de enfermedades inflamatorias se procedió a determinar los valores en muestras de MCV de los grupos en estudio.

Se analizaron 98 muestras de vacas con estatus sanitario uterino S (n=40), ES (n=25) y EC (n=31). La concentración de proteínas fue; en el grupo de vacas S de 0.8 ± 0.6 g/dL, ES 1.1 ± 1.0 g/dL y EC 2.0 ± 1.5 g/dL (Gráfico 9). Se aplicó el test estadístico Kruskal-Wallis y se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p < 0.0001$). Se compararon luego los grupos entre si mediante el test Mann-Whitney el cual demostró que hay diferencias entre la concentración de proteínas al comparar el grupo EC con ES ($p = 0.0008$) y EC con S ($p < 0.0001$), pero no hay diferencias entre los grupos S y ES ($p = 0.92$) (Gráfico 9).

Al comparar los valores de proteínas entre los grupos S (n=20), ES (n=10) y EC (n=15) en la fase folicular se encontraron diferencias significativas aplicando el test estadístico Kruskal-Wallis ($p = 0.0002$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos S y ES ($p = 0.94$). Se encontraron diferencias entre S y EC ($p < 0.0001$) así como al comparar ES y EC ($p = 0.0012$) (Tabla 16).

Se encontraron diferencias en los valores de proteínas entre los grupos S (n=11), ES (n=12) y EC (n=11) en la fase lútea, aplicando el test estadístico Kruskal-Wallis ($p = 0.005$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos S y ES ($p = 0.83$), pero si se encontraron diferencias al comparar S y EC ($p = 0.0008$) así como entre ES y EC ($p = 0.01$) (Tabla 16).

Gráfico 9. Concentración de proteínas totales (g/dL) en muestras de MCV de los grupos con estatus sanitario uterino sano, endometritis subclínica y endometritis clínica



Concentración de proteínas totales (g/dL) en MCV bovino de vacas con estatus sanitario uterino sano (n=40), con endometritis subclínica (n=25) y con endometritis clínica (n=31). ^{a, b} Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas en la concentración de proteínas totales entre los grupos ($p < 0.05$).

Tabla 16. Proteínas totales en muestras de MCV de hembras con estatus sanitario uterino sano, endometritis subclínica y endometritis clínica

Proteínas totales (g/dL)	S	ES	EC
GRUPO	0.8 ± 0.6^a	1.1 ± 1.0^a	2.0 ± 1.5^b
FASE FOLICULAR	0.7 ± 0.5^a	0.7 ± 0.5^a	1.9 ± 0.1^b
FASE LÚTEA	0.7 ± 0.4^a	1.1 ± 1.0^a	2.2 ± 1.3^b

Concentración de proteínas totales (media \pm DE) en muestras de MCV de vacas con estatus sanitario uterino sano (n=40) en FF (n=20) y FL (n=11), vacas ES (n=25) en FF (n=10) y FL (n=14), y vacas EC (n=31) en FF (n=15) y en FL (n=11). ^{a, b} Letras diferentes asignadas en cada fila indican diferencias estadísticas significativas en la concentración de proteínas totales ($p < 0.05$).

6.4.4.1 Determinación de proteínas totales a partir del índice de refracción de las muestras

La refractometría es utilizada para la determinación indirecta de la concentración de proteínas totales. Al igual que lo aplicado para ST, se evaluó el método refractométrico para la determinación de proteínas. Se realizó una curva de calibración entre concentraciones de albúmina crecientes (0.5%, 1%, 2% ,4%) y la R. Se aplicó un análisis de regresión lineal y con la ecuación obtenida se calcularon los valores de cPT y se compararon con los valores de PTBCA.

Al realizar el match entre los valores de albúmina y valores de refractividad, se obtuvo una regresión lineal con un coeficiente de regresión (r^2) = 1 y pendiente 14.76 (Gráfico 10). La ecuación matemática resultante fue:
 $cPT \text{ (g/dL)} = (R - 11.46) / 14.76$

Se encontraron diferencias significativas al comparar los valores de PTBCA y cPT ($p < 0.0001$) (Gráfico 11).

Gráfico 10. Regresión lineal entre concentración de albúmina (g/dL) y valores de refractividad de muestras de MCV

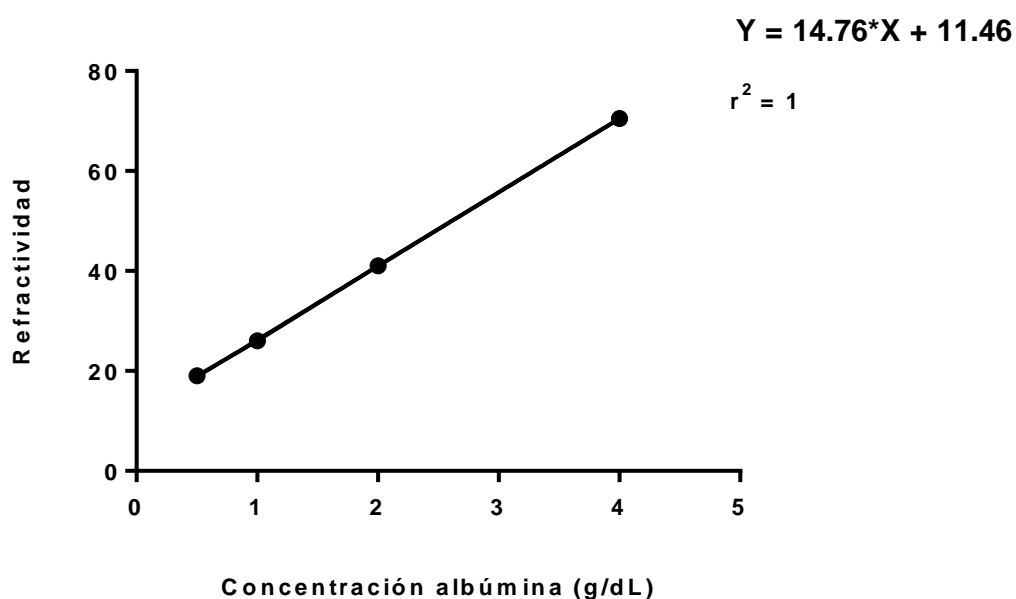
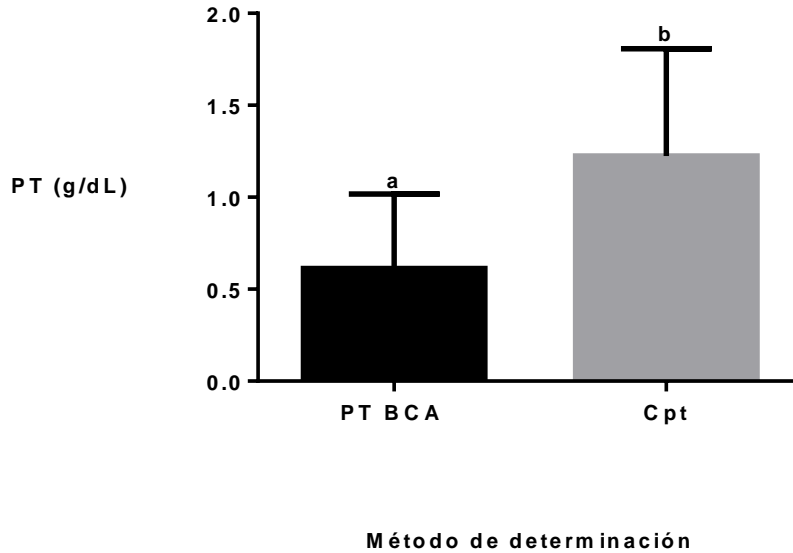


Gráfico 11. Concentración de proteínas totales (g/dL) en muestras de MCV determinada mediante la técnica del Ácido Bicinconínico y mediante el valor del índice de refracción



Concentración de proteínas totales (g/dL) en MCV bovino, determinadas mediante la técnica del Ácido Bicinconínico (PTBCA) (n= 39) y mediante el valor del índice de refracción, aplicando la ecuación obtenida (cPT) (n=39). ^{a, b} Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas en la concentración de proteínas totales (p<0.05).

6.4.5 Determinación de iones

Los iones forman parte de la porción soluble del MCV, son responsables de la hidratación del mucus, por lo cual regulan el volumen y la consistencia del mismo. Las modificaciones en la concentración de iones podrían llevar a un desequilibrio en la hidratación y osmolalidad del MCV, por lo cual se llevó a cabo el análisis de los electrolitos: Na⁺, K⁺ y Mg²⁺ (cofactor de la enzima ATPASA Na⁺/ K⁺).

6.4.5.1 Determinación de Na⁺

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos en estudio S (n=18), ES (n=20), EC (n =18) (p=0.06). La concentración de Na⁺ determinada en hembras S fue 110 ± 18 (meq/L), en hembras con ES 94 ± 22 (meq/L) y 99 ± 19 (meq/L) en vacas con EC. No se encontraron diferencias (p=0.69) al comparar los grupos en la fase folicular (n=29) y en la fase lútea (n=20) (p=0.11).

6.4.5.2 Determinación de K⁺

Se realizó un análisis descriptivo de la concentración de potasio (Tabla 17). Se encontraron diferencias significativas al comparar los grupos (p=0.02) aplicando el test estadístico Mann-Whitney. Así como al comparar cada grupo en particular, ES vs S (p=0.002) y EC vs ES (p=0.01). No se encontraron diferencias de K⁺ entre las hembras S y EC (p=0.47).

Se encontraron diferencias estadísticas (p=0.01) al comparar los grupos (n=29) en la fase folicular. La concentración de K⁺ resultó mayor en hembras que presentaron ES con respecto a hembras del grupo sano (p=0.01).

Tabla 17. Determinación de potasio en muestras de MCV de los grupos experimentales

K ⁺ (meq/L)	S	ES	EC
Media + SD	12 ± 5 ^a	25 ± 16 ^b	13 ± 6 ^a
Valor mínimo	5	7	6.5
Mediana	11	18	13
Valor máximo	25	54	31

Determinación de potasio (media ± DE) en muestras de mucus en diferentes estatus sanitarios uterinos; S (n=18), ES (n=20), EC (n=18). ^{a, b} Letras diferentes asignadas en

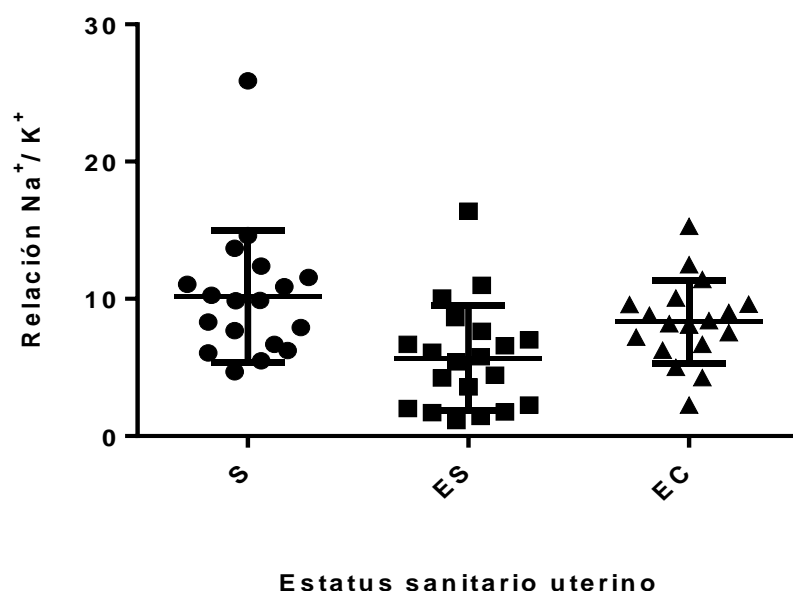
cada fila indican diferencias estadísticas significativas en la concentración de potasio ($p < 0.05$).

6.4.5.3 Relación Na^+/K^+ según estatus sanitario uterino

La relación Na^+/K^+ en hembras con estatus uterino sano ($n=17$) fue 9.2 ± 2.9 , en vacas con EC ($n=18$) 8.3 ± 3 y en vacas con ES ($n=20$) 5.7 ± 4 (Gráfico 12).

Se encontraron diferencias al comparar los grupos ($p=0.003$) y al comparar en particular vacas S vs vacas ES ($p=0.003$) y ES vs EC ($p=0.008$). Así como también se encontraron diferencias al comparar los grupos S ($n=13$), ES ($n=8$) y EC ($n=8$) en la fase folicular ($p=0.04$). La relación Na^+/K^+ resultó menor en hembras con ES que en hembras con estatus sanitario uterino sano ($p=0.02$).

Gráfico 12. Relación Na^+/K^+ según estatus sanitario uterino



Relación Na^+/K^+ en muestras de moco cérvico-vaginal bovino en diferentes estatus sanitarios uterinos; Sano (S) ($n=17$), con endometritis subclínica (ES) ($n=20$) y con endometritis clínica (EC) ($n=18$).

6.4.5.4 Determinación de Mg^{2+}

No se encontraron diferencias significativas en la concentración de Mg^{2+} entre los grupos S, ES y EC ($p=0.46$). Tampoco se encontraron diferencias entre los grupos al compararlos en la fase folicular ($p=0.36$) y lútea ($p=0.62$) (Tabla 18).

Tabla 18. Determinación de magnesio en muestras de MCV de los grupos experimentales

Magnesio (mg/dL)	S	ES	EC
GRUPO	1.71 ± 0.64 ^a	1.27 ± 0.58 ^a	0.99 ± 0.37 ^a
FASE FOLICULAR	1.02 ± 0.70 ^a	1.12 ± 0.57 ^a	1.05 ± 0.27 ^a
FASE LÚTEA	1.39 ± 0.46 ^a	1.40 ± 0.60 ^a	1.11 ± 0.42 ^a

Valores de Magnesio (media ± DE) en muestras de MCV de estatus sanitario uterino sano ($n=30$), con endometritis subclínica ($n=20$) y con endometritis clínica ($n=19$). Fase folicular S ($n=17$), ES ($n=8$), EC ($n=9$). Fase lútea S ($n=8$), Es ($n=11$), EC ($n=5$). ^a Letras diferentes asignadas en cada fila indican diferencias estadísticas significativas en la concentración de magnesio ($p<0.05$).

6.5 Análisis multivariado de los datos

6.5.1 Matriz de correlación

Se encontró una correlación positiva entre:

- Esterasa Leucocitaria con PT, ST, R y % PMN N. Presentando valores de correlación moderada.
- Los valores de K^+ ; con Mg^{2+} (débil) y grado de cristalización de las muestras (moderada).

- El % PMN N con las variables GC, PT, R, ST, LE. Presentando valores de correlación débil.

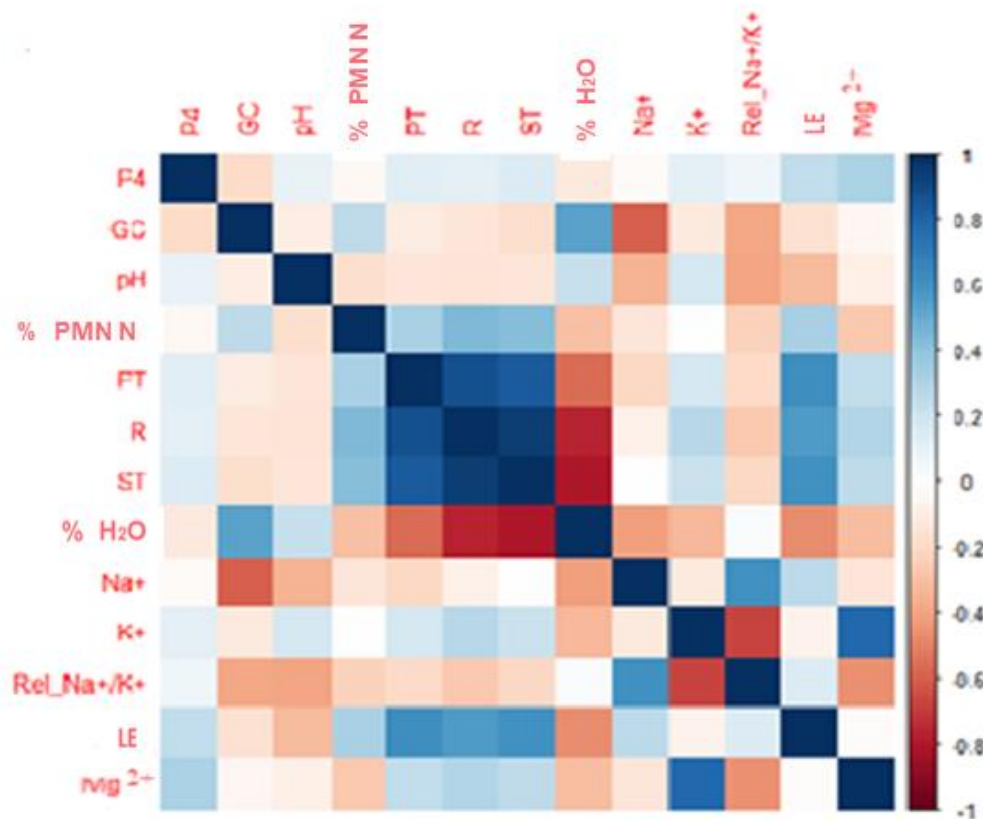
Los valores de correlación se describen en la Tabla 19 y en el Gráfico 13.

Tabla 19. Matriz de correlación entre las variables cuantitativas en estudio

	P4	GC	pH	%PMNN	PT	R	ST	%H ₂ O	Na ⁺	K ⁺	R _{Na⁺/K⁺}	LE	Mg ²⁺
P4	1	-0.06	0.17	-0.09	0.33	0.27	0.27	-0.23	-0.1	0.04	0.02	0.29	0.22
GC	-0.06	1	-0.02	0.22	0.02	-0.03	-0.08	0.4	-0.54	0.53	-0.5	-0.09	0.25
pH	0.17	-0.02	1	-0.15	-0.2	-0.22	-0.2	0.24	-0.39	0.14	-0.44	-0.5	-0.03
%PMNN	-0.09	0.22	-0.15	1	0.3	0.29	0.23	-0.05	-0.11	-0.07	-0.12	0.32	-0.42
PT	0.33	0.02	-0.2	0.3	1	0.87	0.83	-0.58	-0.25	0.03	-0.15	0.57	0.13
R	0.27	-0.03	-0.22	0.29	0.87	1	0.94	-0.76	-0.14	0.15	-0.24	0.55	0.26
ST	0.27	-0.08	-0.2	0.23	0.83	0.94	1	-0.81	-0.08	0.13	-0.21	0.57	0.28
%H ₂ O	-0.23	0.4	0.24	-0.05	-0.58	-0.76	-0.81	1	-0.34	-0.11	0.03	-0.54	-0.36
Na ⁺	-0.1	-0.54	-0.39	-0.11	-0.25	-0.14	-0.08	-0.34	1	-0.23	0.55	0.3	-0.05
K ⁺	0.04	0.53	0.14	-0.07	0.03	0.15	0.13	-0.11	-0.23	1	-0.75	-0.01	0.79
R _{Na⁺/K⁺}	0.02	-0.5	-0.44	-0.12	-0.15	-0.24	-0.21	0.03	0.55	-0.75	1	0.15	-0.5
LE	0.29	-0.09	-0.5	0.32	0.57	0.55	0.57	-0.54	0.3	-0.01	0.15	1	0.1
Mg ²⁺	0.22	0.25	-0.03	-0.42	0.13	0.26	0.28	-0.36	-0.05	0.79	-0.5	0.1	1

Matriz de correlación entre las variables en estudio. Interpretando el coeficiente como; correlación nula ($r= 0$), débil ($r= \pm 0.2$), moderada ($r= \pm 0.5$), buena ($r= \pm 0.8$), perfecta ($r= 1$) (Roy-Garcia y col. , 2019).

Gráfico 13. Mapa de calor. Nivel de correlación bivariada de Pearson de las variables estudiadas



6.5.2 Análisis de componentes principales

En este estudio se escogieron las tres primeras dimensiones o componentes principales, ya que representan el 63.35% de la varianza (Gráfico 14, Tabla 20).

Gráfico 14. Porcentaje de varianza que representa cada dimensión o componente en estudio

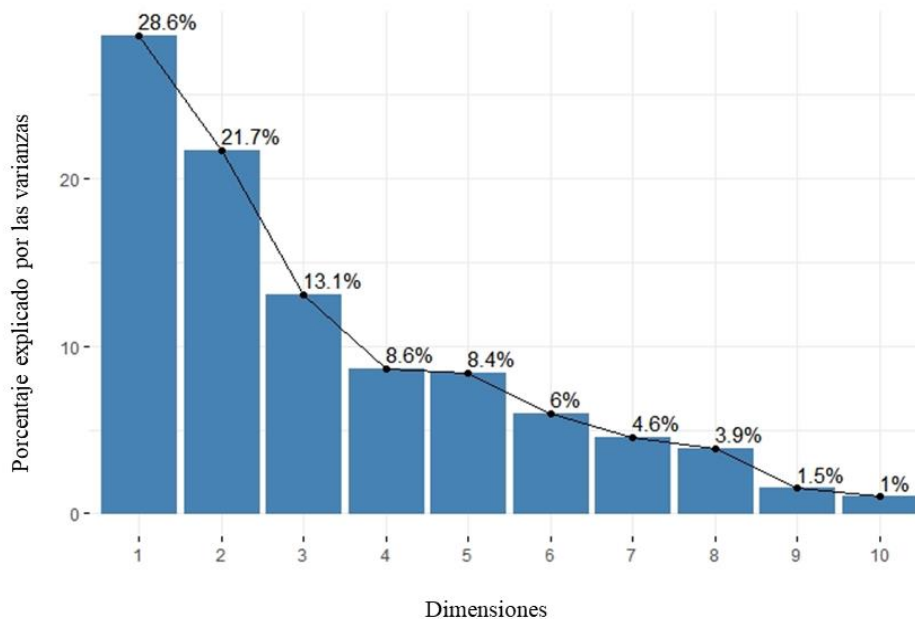


Tabla 20. Análisis de componentes principales

	Valor	Porcentaje de Varianza	Porcentaje de Varianza acumulado
Dim.1	4.57	28.57	28.57
Dim.2	3.47	21.68	50.24
Dim.3	2.10	13.10	63.35
Dim.4	1.38	8.65	72.00
Dim.5	1.34	8.40	80.40
Dim.6	0.96	6.01	86.41
Dim.7	0.73	4.57	90.99
Dim.8	0.62	3.87	94.86
Dim.9	0.24	1.50	96.36
Dim.10	0.16	1.00	97.36
Dim.11	0.14	0.86	98.21
Dim.12	0.10	0.64	98.85
Dim.13	0.08	0.49	99.34
Dim.14	0.06	0.38	99.71
Dim.15	0.04	0.27	99.99
Dim.16	0.00	0.01	100.00

Análisis de componentes principales. Valores de las dimensiones, porcentaje de varianza y porcentaje de varianza acumulada para cada dimensión en estudio.

6.5.2.1 Correlaciones de las componentes principales con las variables en estudio

Variabes más correlacionadas con la Componente Principal 1 (CP1):

Esta componente toma valores elevados en muestras de MCV con altos valores de refractividad, sólidos totales, proteínas totales, magnesio y tira reactiva de leucocitos, acompañado con bajo porcentaje de agua (Tabla 21). Debido a las características de la misma, para modelizarla luego, se le asignó el nombre a la CP1 de “**Inflamación exudativa**”.

Las variables refractividad (R) y sólidos totales (ST), presentan el mayor porcentaje de correlación ($r=0.88$) por lo cual contribuyen fuertemente a la variabilidad explicada por este componente.

Tabla 21. Variables más correlacionadas con CP1

	correlación	P valor
R	0.88	2.46E-39
ST	0.88	2.74E-39
PT	0.77	9.02E-25
Mg²⁺	0.63	8.13E-15
Le	0.59	1.44E-12
% H₂O	-0.76	3.22E-24

Variabes más correlacionadas con la componente principal 2 (CP2):

La CP2 toma valores altos en mucus con elevada concentración de potasio, mayor grado de cristalización y valores elevados de pH, así como con menor relación Na⁺/K⁺ (Tabla 22). Por lo cual se le asignó el nombre a la CP2

de “**desbalance electrolítico**”. La variable que más contribuye en la variabilidad explicada por este componente es la concentración de K^+ .

Tabla 22. Variables más correlacionadas con CP2

	correlación	P valor
K⁺	0.75	4.16E-23
pH	0.47	4.42E-08
GC	0.62	6.55E-14
R_Na⁺/K⁺	-0.72	3.06E-20

Variables más correlacionadas con la componente principal 3 (CP3):

La CP3 toma valores altos en MCV con mayor porcentaje de neutrófilos y bajo Na^+ (Tabla 23). Debido a la característica de alto valor de células inflamatorias como variable de mayor correlación, se denominó a la CP3 “**inflamación celular**”. El porcentaje de neutrófilos tiene una alta correlación positiva y la concentración de Na^+ una correlación negativa.

Tabla 23. Variables más correlacionadas con CP3

	correlación	P valor
% PMN N	0.72	2.17E-20
Na⁺	-0.67	6.46E-17

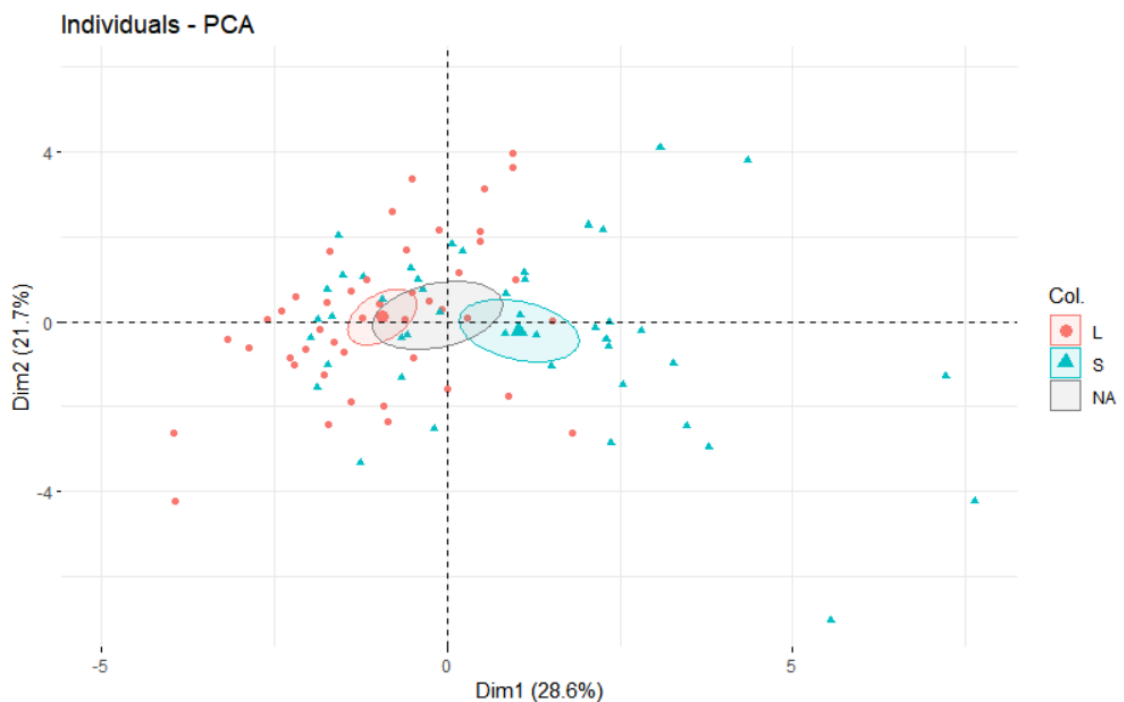
Se analizó si existen diferencias significativas en promedio entre las categorías de las variables cualitativas para cada una de las componentes mediante un test de Kuskal-Wallis y comparaciones múltiples. A continuación, se presentan las diferencias significativas encontradas.

Variable Fondo de extendido:

Inflamación exudativa (CP1):

Los valores del grado de inflamación exudativa difieren en promedio significativamente ($p < 0.0001$) respecto a las categorías de fondo de extendido (Gráfico 15).

Gráfico 15. Gráfico Biplot: CP1 vs CP2 según variable fondo de extendido



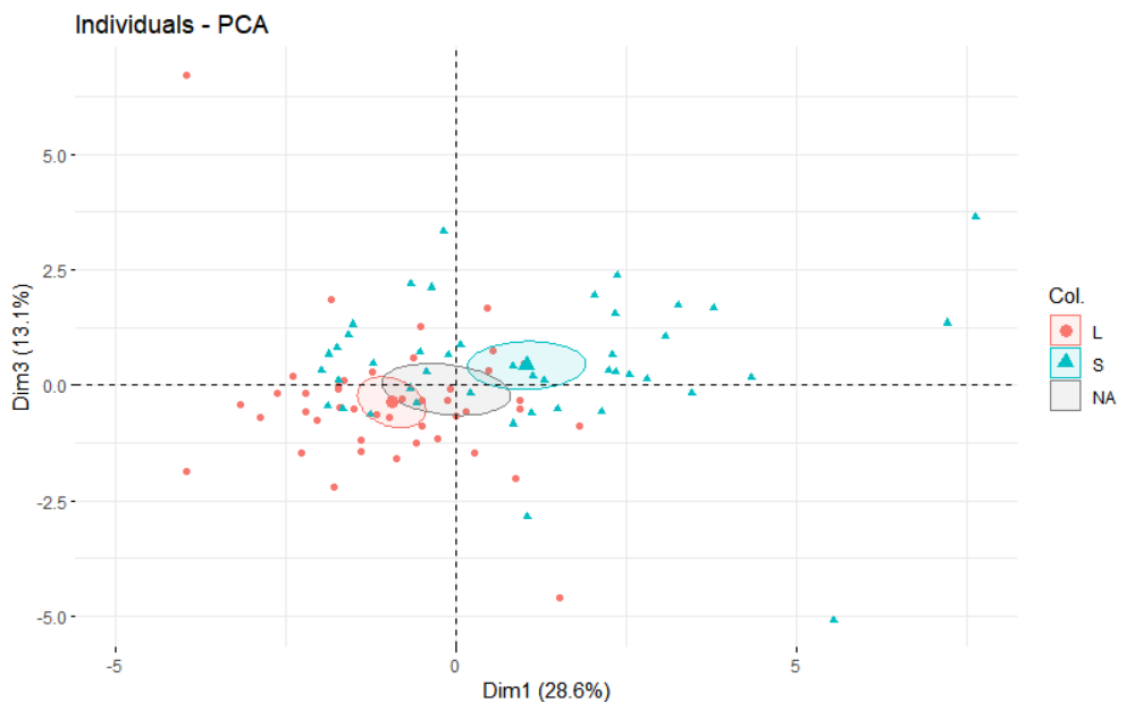
Las muestras de MCV de animales que presentan fondo sucio de extendido tienen valores más elevados del grado de **inflamación exudativa** que los que presentan muestras de fondo limpio. Por lo cual, en muestras con fondos de extendido de tipo sucio, se presentan valores más elevados de

proteínas, sólidos totales, magnesio, refractividad y de actividad de esterasa leucocitaria que en MCV con fondo limpio.

Inflamación Celular (CP3)

Los valores del grado de inflamación celular difieren en promedio significativamente ($p=0.01$) respecto a las categorías de fondo de extendido (Gráfico 16).

Gráfico 16. Gráfico Biplot: CP1 vs CP3 según variable fondo de extendido



Las muestras de MCV de animales que presentan fondo sucio de extendido tienen valores más elevados del grado de **inflamación celular** que

los muestras con fondo limpio. Por lo cual, en muestras con FE sucio, se presenta mayor recuento de PMN N en el CB y menor concentración de Na⁺ en el MCV, que en hembras con lectura de fondo de tipo limpio.

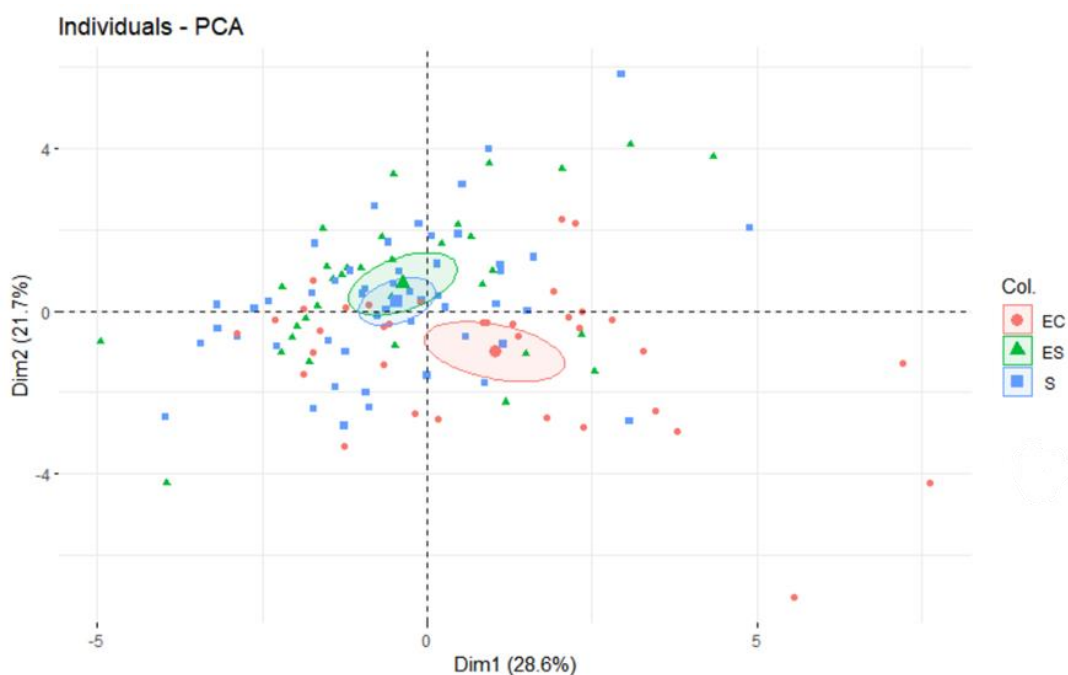
Variable Estatus Sanitario Uterino:

Inflamación exudativa (CP1):

Los valores del grado de **inflamación exudativa** difieren en promedio significativamente ($p=0.026$) respecto a las categorías de estatus sanitario uterino (Gráfico 17).

Las hembras con estatus uterino EC presentan valores significativamente más altos del grado de inflamación exudativa que los de estatus sanitario uterino sano. En MCV de vacas con EC se presentan valores más altos de refractividad, sólidos totales, proteínas totales, magnesio y de tira reactiva de leucocitos, así como valores más bajos del porcentaje de agua que en MCV de vacas con estatus uterino sano.

Gráfico 17. Gráfico Biplot: CP1 vs CP2 según estatus sanitario uterino



Desbalance electrolítico (CP2):

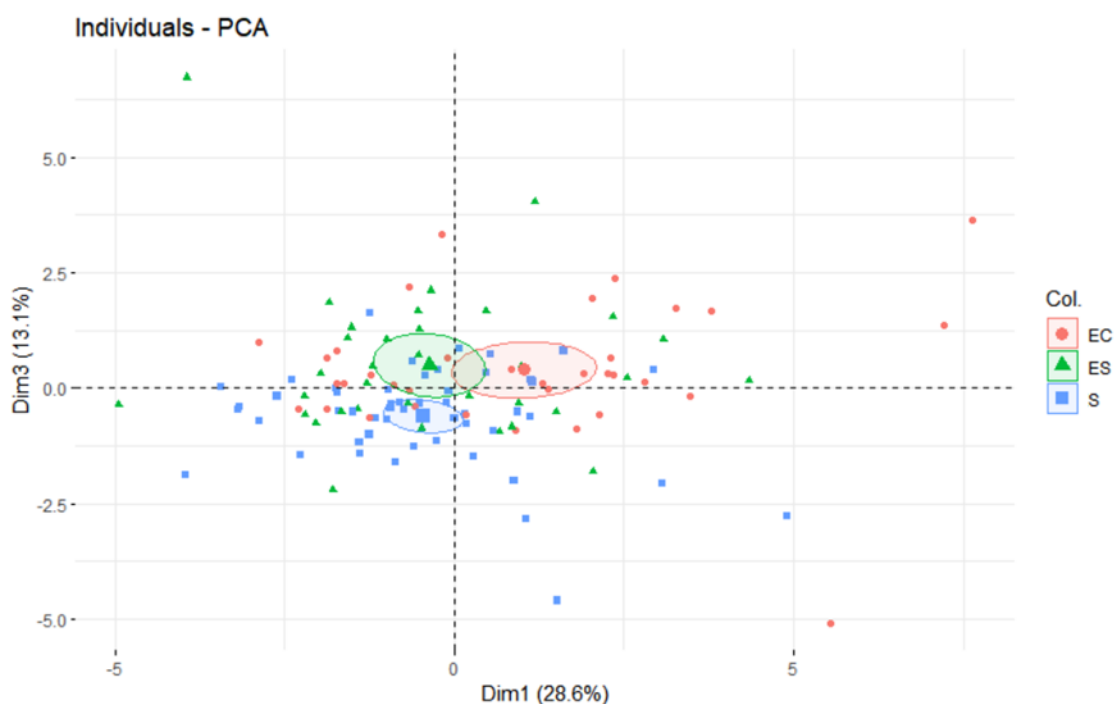
Los valores del grado de desbalance electrolítico difieren en promedio significativamente ($p=0.0005$) respecto a las categorías de estatus sanitario uterino.

Las hembras que cursan con ES presentan en general valores más elevados de K^+ , pH, grado de cristalización y valores más bajos de relación Na^+/K^+ en MCV que los animales con endometritis clínica.

Inflamación Celular (CP3):

Los valores del nivel de **inflamación celular** difieren en promedio significativamente ($p<0.0001$) respecto a las categorías de estatus sanitario uterino (Gráfico 18).

Gráfico 18. Gráfico Biplot: CP1 vs CP3 según estatus sanitario uterino



Los animales con endometritis clínica y subclínica tienen valores más elevados del grado de inflamación celular que los de estatus sanitario uterino sano, ya que en general en el estatus uterino EC y ES los animales presentan valores más altos de % PMN N en *cytobrush* y más bajos de Na⁺ en muestras de MCV, que en hembras sanas.

6.5.3 Árboles de clasificación

Se empleó el estudio de los árboles de clasificación para asignar el estatus sanitario uterino a un animal a partir de la información obtenida del análisis del MCV (Gráfico 19).

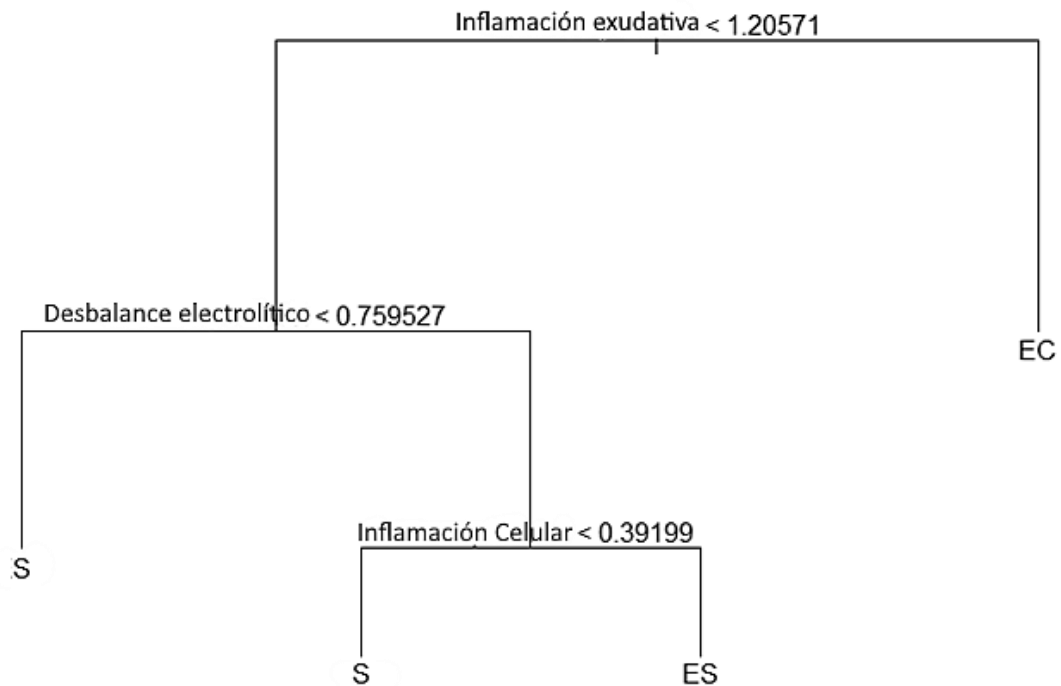
Las variables que demostraron una buena discriminación de los grupos son; grado de inflamación exudativa (CP1), grado de desbalance electrolítico (CP2) y grado de inflamación celular (CP3). El árbol final presentó 4 nodos terminales.

El Gráfico 19 muestra el árbol resultante de esta aplicación. La variable explicativa, o más fuertemente asociada con el estatus sanitario uterino, es el nivel de inflamación exudativa, categorizada como superiores e inferiores a 1.205.

El conjunto de animales quedó dividido en dos grupos, los que presentan valores mayores a 1.205 en el nivel de **inflamación exudativa** y los que no. Este primer subgrupo es clasificado como endometritis clínica y constituye un nodo terminal, mientras que el grupo con menos 1.205 en el grado de inflamación exudativa es dividido nuevamente. El predictor más relevante en esta segunda división fue el nivel de **desbalance electrolítico**, categorizada en inferior y superior a 0.759. El subgrupo con un valor del nivel de desbalance electrolítico inferior a 0.759 (que ya tenían definido valor de grado de inflamación exudativa inferior a 1.205) es clasificado como sano y constituyen el segundo nodo terminal. Por otro lado, el grupo con un valor del grado de desbalance electrolítico superior al 0.759 (y con un valor de grado de inflamación exudativa inferior a 1.205) se subdivide respecto al grado de

inflamación celular, definiendo un nuevo nodo terminal para aquellos que presentan un valor de grado de inflamación celular inferior a 0.391, clasificando como sanos, mientras que si éste es superior a 0.391 se clasifican como animales con endometritis subclínica. El porcentaje de mala clasificación obtenido para este árbol fue de un 25%.

Gráfico 19. Árbol de clasificación para determinar el estatus sanitario uterino de la vaca a partir del análisis de muestras de MCV y CB



7 DISCUSIÓN

Las enfermedades del postparto en la vaca lechera son de suma importancia para la posterior performance reproductiva y productiva del animal. La endometritis produce un aumento del intervalo parto concepción y por lo tanto del intervalo entre un parto y el siguiente, además tiene efecto negativo sobre la producción de leche y aumenta los costos de tratamientos, así como los descartes de animales. En este trabajo se encontró un 53% de vacas con endometritis (EC y ES) en el postparto, muestreadas en la cuenca lechera de Santa Fe, Argentina, en el periodo 2017-2021. La prevalencia de EC hallada fue 28%, valores mayores a los reportados de 21.8% por Madoz y col., (2008) en tres establecimientos de Argentina. La prevalencia de ES resultó en un 25%, tomando en este estudio vacas sanas, con ES y con EC. De las hembras bovinas clínicamente sanas (aquellas que presentaron flujo tipo cero) muestreadas desde los 21 a los 56 días, el 35% se diagnosticó con endometritis subclínica, por lo tanto, aproximadamente 1 de cada 3 vacas que fueron liberadas a servicios y posterior inseminación, cursaban con ES. Los valores de prevalencia obtenidos son mayores a los reportados para la cuenca lechera santafesina por Rinaudo, en el año 2012 (19%) y por Cieloswki y col., en el año 2017 (30.6%). La prevalencia de ES en el primer periodo postparto (3-5 semanas) (31%) fue menor a lo obtenido por Plöntzke y col., (2010) (38%) y mayor a lo encontrado por Madoz y col., en el año 2008 (10.1%) y 2013 (21.5%), en rodeos de la cuenca lechera de Buenos Aires. Así como también, resultó menor la prevalencia al evaluarla en la semana 5-7 postparto (16%) a los valores informados por Plöntzke y col., (2010) (19%).

La prevalencia registrada concuerda con los estudios realizados en otros países, Kasimanickam y col., (2004) reportaron 35.1% en sistemas intensivos estabulados de Canadá y Galvão y col., (2009) hallaron valores de 37.9%-38.4% en establecimientos lecheros de Nueva York (3-5 semanas postparto). Sin embargo, hay diferencias con los relevamientos de otros autores, ya que es mayor a lo encontrado por Barlund y col., (2008) (15.8%), Dubuc y col., (2010) (19.3%), Lopdell y col., (2011) (7%), Heidarpour y col., (2012) (13.5%), Barrio y col., (2014) (17.6%) y

menor a lo encontrado por Gilbert y col., (2005) (53%) y Hammon y col., (2006) (51.8%), en rodeos de EEUU.

La prevalencia de ES descendió con los días en leche, de 31% (3-5 semana) a 16% (5-7 semana), datos que concuerdan con Plöntzke y col., (2010) (19%), Dubuc y col., (2010) (11.1%), Madoz y col., (2013) (16%). Pero luego de la séptima semana postparto la prevalencia aumentó notablemente al porcentaje más elevado, 52%. Este valor supera ampliamente lo reportado por Dubuc y col., (2010) (11.1%), Madoz y col., (2013) (16%), Pascottini y col., (2016) (27.8%). El aumento de la prevalencia podría deberse a una deficiencia nutricional postparto o a una alteración inmunológica u hormonal. Es importante evaluar que sucede en ese periodo, ya que es el momento en que la hembra debería liberarse a su primer servicio.

Con respecto a la distribución de las enfermedades uterinas estudiadas a lo largo del año, se encontraron diferencias. La mejor performance reproductiva fue en primavera, ya que el 50% de hembras presentó estatus uterino sanitario sano y 50% endometritis (ES y EC). Por el contrario, en la estación otoño el 46% de hembras tuvieron un estatus uterino sanitario sano y el 54% presentó algún grado de endometritis. Esta diferencia coincide con que la condición corporal de las hembras muestreadas tomó valores más altos en la estación primavera y más bajos en otoño. Un menor valor de CC postparto se encontró relacionado con un mayor número de animales con endometritis y un valor superior de CC con un incremento en el número de animales con estatus sanitario uterino sano. A diferencia de estos resultados, en un trabajo realizado en Brasil se evaluaron diferentes estaciones del año y no se encontraron diferencias significativas en la prevalencia al comparar la temporada de parto verano/primavera e invierno/otoño (Carneiro y col., 2014), esto podría deberse a que se tomaron dos estaciones en conjunto en vez de estudiarlas por separado o a diferentes manejos del sistema productivo y tipo de clima. Senosy y col., (2018) tampoco hallaron relación entre la temporada de parto y la prevalencia de ES, en un estudio realizado en un hato de Japón, pero si encontraron relación entre la temporada de parto y; la CC, metabolitos sanguíneos y reanudación de la ovulación, reportando valores mayores de NEFA durante el invierno (Senosy y col., 2018), lo cual podría explicar la mayor prevalencia encontrada en este estudio de ES en esta época del año.

El mayor porcentaje de hembras con estatus uterino sanitario sano encontrado en la primavera, podría relacionarse con una mejor oferta y calidad forrajera de la pastura, que conlleva a una superior performance de CC del rodeo y un menor balance energético negativo. Debido a que, cuando el animal entra en BEN se producen aumentos sanguíneos de ácidos grasos no esterificados, los cuales son asociados con la disminución de la función fagocítica, alteración de la quimiotaxis de los PMN N y con la aparición de trastornos reproductivos (Sartorelli y col., 2000). Por lo cual, los trastornos metabólicos conducen a una mayor prevalencia de endometritis clínica y subclínica en el rodeo (Kim & Kang., 2003; Cheong y col., 2011; Adnane y col., 2017). Cheong y col., (2011) determinaron que la cetosis y el valor de la condición corporal son factores de riesgo para ES y EC. La CC en las semanas previas y posteriores al parto afecta la salud uterina, ya que se demostró que las hembras bovinas que tenían valores más bajos de CC, presentaron mayor porcentaje de endometritis (Kadivar y col., 2014), así como las vacas con valores de CC bajo (≤ 2.5) a los 30 días posparto presentaron prevalencias significativamente más altas de ES (Carneiro y col., 2014; Adnane y col., 2017). Estos resultados concuerdan con los mayores porcentajes de endometritis encontrados en este trabajo en las vacas muestreadas en otoño, con CC de 2.4 ± 0.3 . Por lo cual el impacto de la estación del año y de la condición corporal, debería investigarse profundamente para adoptar luego medidas de manejo reproductivas de acuerdo a la época del año y al lugar de producción.

En la producción lechera generalmente, existe mucha presión de selección sobre los caracteres del macho analizando; diferencias esperadas de progenie, caracteres heredables a las hijas, fertilidad, motilidad de gametas, porcentaje de espermatozoides vivos/muertos y alteraciones morfológicas o de membrana de estos, pero no se tiene en cuenta a la hora de realizar los servicios las características del ambiente reproductor de la hembra. El MCV juega un papel clave en la reproducción debido a que aloja, nutre, transporta y selecciona a las gametas masculinas que van a fecundar al ovocito.

Las características el MCV como; pH, apariencia y viscosidad son herramientas útiles para predecir la fertilidad de las hembras bovinas (Tsiligianni y col., 2001a; Abd-EIHafeez y col., 2020).

En este ensayo se encontraron todos los tipos de flujo, MCV purulento y con ausencia de pus. El flujo tipo 0 se visualizó transparente y turbio. No se encontró relación significativa entre la turbidez con el estatus sanitario uterino ES. Al realizar la evaluación de los extendidos de fondo de preparado, se encontró que los tipos de fondo limpio y sucio se presentaron en todos los estatus sanitarios uterinos, pero el porcentaje de fondo sucio fue mayor en vacas con endometritis. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar el tipo de fondo entre los grupos experimentales sano y ES, así como S con EC y ES con EC. En las muestras de MCV purulentas el 97% de los preparados presentó fondo sucio y solo el 2% fondo de tipo limpio, que se correspondió a flujos de tipo purulento 1 (menos del 50% de pus), en cambio en el tipo purulento 2 el 100% presentó un fondo de extendido sucio, resultado que es de esperarse ya que presenta más del 50% de pus en su composición.

En las muestras de MCV tipo 0, el flujo transparente se asoció a un mayor porcentaje de fondo limpio y el flujo turbio al fondo sucio. Se ha reportado una relación negativa entre la turbidez del flujo y la fertilidad, vacas con moco cervical transparente, delgado y de pH óptimo (7-7.5) al momento de la IA, obtuvieron mayor tasa de concepción que vacas con moco con apariencia opaca o sucia (Modi y col., 2011; Abd-ElHafeez y col., 2020). Esto podría deberse a que el moco en el momento del celo que es transparente conduce a la gameta masculina favoreciendo su transporte, en cambio el flujo turbio afecta la movilidad del espermatozoide (Modi y col., 2011; Lim y col., 2014).

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el % PMN N de fondo limpio y sucio. Los extendidos de MCV con fondo limpio presentaron 1.75 ± 1.76 % PMN N y los extendidos de tipo sucio 8.76 ± 6.7 % PMN N. Los extendidos de fondo limpio presentaron un máximo de 6% PMN N en la citología endometrial, es decir que las hembras con ES que se encuentran en el límite de detección para la enfermedad (punto de corte 5% PMN N) son las que se podrían prestar a confusión o interferir en la especificidad de la técnica.

En cuanto a la utilización del fondo de extendido como técnica diagnóstica para EC, la prueba resultó en elevada sensibilidad (93%) y especificidad (85%). Para

ES la especificidad (85%) fue alta pero la sensibilidad no (58%). Por lo cual esta técnica permitiría un correcto diagnóstico de EC, pero no de ES, ya que un porcentaje elevado de hembras con ES presentaron fondo limpio. Sin embargo, la lectura del fondo podría contribuir en la evaluación del estado reproductivo en procedimientos que lo requieran, como por ejemplo, en protocolos de transferencia de embriones en los cuales se recomienda el examen citológico de la mucosa uterina de las hembras donantes (Fernandez-Sanchez y col., 2014), ya que existe una correlación negativa entre el % PMN N obtenidos por cytobrush y el porcentaje de embriones recuperados luego del lavado, así como con el porcentaje de cigotos aptos para transferir (Drillich y col., 2012). El estudio de los extendidos de MCV podría aplicarse en el momento de examinación de la hembra donante y receptora, ya que es rápido, fácil de hacer, no requiere tinción, no es invasivo y se correlaciona con el % PMN N en el útero.

El pH es una propiedad del MCV que indica la calidad del mismo y tiene una gran influencia sobre la viabilidad de los espermatozoides (Eggert-Kruse y col., 1993). Los valores de pH obtenidos presentaron diferencias entre el grupo ES con el grupo S y EC. En las muestras del grupo con endometritis subclínica se obtuvo valores de pH de MCV más alcalinos que en el resto de los grupos, resultados que coinciden con lo reportado por Cheong y col., (2012) en ensayos realizados en lavados uterinos. El aumento del pH podría deberse a un incremento de la permeabilidad capilar, que permite que elementos alcalinizantes de la sangre (Na^+ y HCO_3^-) ingresen a la secreción, como ocurre en caso de mastitis en la leche (Marschke & Kitchen, 1985). Se halló un aumento del pH en muestras de leche de vacas con mastitis clínica y subclínica (Qayyum y col., 2016). Tsiligianni y col., (2001a) describieron que el pH encontrado in situ en cérvix varió de 6.98 a 6.92 en el periodo de proestro, de 6.5 a 6.7 en el estro, de 6.69 a 6.93 en el metaestro y de 6.91 a 6.94 en el diestro. Las diferencias de valores de pH encontradas en este trabajo, en el grupo sano podrían deberse a que, al medir in vitro el pH aumenta de 0.6 a 0.7 puntos debido a la pérdida de CO_2 al exponerse al aire (Tsiligianni y col., 2001a). En la fase folicular se encontró en hembras sanas un pH de 8.2 ± 0.5 , con un valor mínimo de 7 y mediana de 8.2, en el grupo ES se encontraron valores de 8.7 ± 0.3 , valor mínimo 8.5 y mediana 8.5. Las amplitudes entre los valores en cada

grupo pueden deberse a que las vacas se muestrearon en la fase folicular, por lo cual algunas hembras se encontraban en proestro y otras en estro. De todos modos, se encontraron en las hembras ES valores significativamente más elevados, con un mínimo de 8.5 que sobrepasa ampliamente el valor de 7 en el momento del estro. Un MCV más alcalino se ha relacionado con disminución de la tasa de preñez en vacas (Bernardi y col., 2018; Abd-ElHafeez y col., 2020) y el porcentaje de concepción en mujeres (Eggert-Kruse y col., 1993). Vacas que presentaron en muestras de lavados uterinos valores de pH mayor a 7 lograron más tarde la preñez, que aquellas con valores menores de pH (150.5 vs 111.5 días sin preñez) (Cheong y col., 2012). Siregar y col., (2019) informaron que las hembras bovinas que presentaron al momento el celo moco con rango de pH 7-8 obtuvieron tasas más altas de concepción (50%) que aquellas con pH 6 y 9 (0%). Esto podría deberse a lo postulado por Hafez y Hafez (2013), que sostiene que los espermatozoides se diluyen con las secreciones del tracto reproductor femenino y son susceptibles a los cambios de pH, como alcalinidad o acidez excesiva, ya que causan inmovilización de las gametas masculinas. Bedewy & Rahawy (2019) hallaron resultados similares a los obtenidos en este estudio, debido a que reportaron valores de moco más alcalino en vacas con ES (7.8), que en vacas sanas (7.2) al momento del estro. Además, al realizar la prueba de penetración espermática detectaron que los espermatozoides morían luego de una corta distancia de atravesar el moco afirmando lo descrito por Hafez y Hafez (2013). Por lo cual, la alcalinidad del pH en las secreciones uterinas de vacas con endometritis subclínica podría ser una de las causas que reducen la tasa de preñez.

La ES se caracteriza por la presencia de polimorfonucleares neutrófilos en la luz. El método de la esterasa leucocitaria permite obtener información sobre el estado inflamatorio de una muestra, la esterasa se libera desde los gránulos de los leucocitos y escinde un derivado del éster pirazol aminoácido, liberando un derivado de hidroxipirazol, el cual reacciona con la sal de diazonio resultando en un color violeta. Se utiliza de rutina en la clínica veterinaria en muestras de orina, líquido peritoneal, cefalorraquídeo, pericárdico y en el estudio de exudados para determinar el estado inflamatorio del paciente. En muestras de MCV el test de esterasa leucocitaria arrojó para ES y EC buena sensibilidad (86%-96%), buena especificidad

(95%-94%), otorgando una utilidad altamente relevante para ambas categorías, resultados que concuerdan con los obtenidos por; Asfar y col., (2021) en muestras de MCV (Se 86.67%, Esp 66.67%) (punto de corte $> \pm$ LE) y por Santos y col., (2006) (Se 96%, Esp 98%) para la prueba en muestras de vacas con CB positivo a ES. Cheong y col., (2012) hallaron valores de Se 77%, Esp 51%, en estudios realizados en lavados uterinos utilizando el punto de corte $LE \geq 2$ (CB 10 % PMN N) otorgado por curva ROC y al igual que Couto y col., (2013) encontraron pobre asociación entre performance de preñez y valores de tiras reactivas. Se reportó una fuerte asociación entre % PMN N en CB y prueba de esterasa leucocitaria, realizada en lavados e in situ en cérvix (Couto y col., 2013), resultados que concuerdan con lo hallado en este estudio para cada valor de LE (0, 0.5 y 1). El congelamiento de las muestras de MCV y protocolo de homogeneización no alteró la actividad de LE.

Debido a las características del MCV, es necesario realizar un procesamiento del mismo que permita obtener una muestra soluble para realizar determinaciones bioquímicas confiables y para poder pipetear pequeños volúmenes de mucus. Rutinariamente se utilizan agentes reductores para analizar biomarcadores como N-acetil-L-cisteína y ditiotreitól, los cuales reducen los puentes disulfuro del enlace de mucinas, homogeneizando la mucosidad (Adnane y col., 2018a). El inconveniente es que muchos biomarcadores o distintos tipos de proteínas tienen enlaces disulfuro por lo cual, la utilización de estos compuestos puede afectar las determinaciones. El Triton X-100[®] es un detergente no iónico, suave y relativamente no desnaturizante, ya que, rompe las interacciones lípido-lípido en vez de las interacciones entre las proteínas, permitiendo asilar las proteínas en su forma biológica activa debido a que no altera la estructura de las mismas (Seddon y col., 2004). Por ello el Triton X-100[®] es uno de los agentes que más se utilizan para solubilizar biomembranas (Mattei y col., 2017). Por los motivos anteriormente mencionados, se utilizó este detergente para el protocolo de homogeneización de las muestras de MCV. La concentración de detergente que logró la licuefacción del mucus, no dejó residuos sólidos, no produjo espuma en abundancia, no alteró las determinaciones a medir (ST, IR, PT, Na⁺, K⁺) y permitió manipular pequeños volúmenes de mucus fue la adición de 0.01% (V/V). Las otras tres concentraciones probadas produjeron abundante espuma y dejaron residuos sólidos en la muestra. Por lo tanto, el protocolo utilizado en este ensayo,

sería una alternativa confiable a los agentes reductores para el procesamiento del MCV bovino.

Los sólidos totales son los solutos que contiene una muestra, comprendido por sustancias orgánicas e inorgánicas como; proteínas, úrea, electrolitos y lípidos (Rodríguez, 2018). En este ensayo, no se encontraron diferencias significativas en la concentración de ST entre el grupo sano y ES, si se encontraron al compararlos con el grupo EC. La medición de ST en patologías como vesiculitis en toros, es un método que permite evaluar la calidad del seminal del reproductor (Foote, 1969), ya que las glándulas vesiculares son las encargadas de secretar la parte sólida del plasma seminal (proteínas y fructosa), la cual disminuye en procesos inflamatorios (Blom, 1969). Los ST pueden determinarse de forma gravimétrica por desecación, método que requiere un tiempo exhaustivo y equipamiento especial en el laboratorio (balanza analítica, estufa de aire forzado), o pueden determinarse mediante la refractometría, la cual es una técnica simple, rápida y barata, que se utiliza en la clínica veterinaria para determinar la concentración de solutos en plasma, orina y en varios fluidos de cavidades como peritoneal y pericárdica (George, 2001; Rodríguez, 2018). El índice de refracción, se define como el cambio del ángulo de refracción de la luz producido por la concentración de los solutos de la muestra frente a la refracción de la luz en el aire y es directamente proporcional a la concentración total de sólidos de la muestra (Rodríguez, 2018), por ello es una herramienta que es frecuentemente utilizada para evaluar la concentración de PT y porcentaje de ST, en el calostro y suero bovino. Hasta el momento no se han reportado estudios de la refractividad en muestras de moco cérvico-vaginal bovino. En este estudio, el coeficiente de regresión lineal obtenido ($r= 0.91$) indicó una fuerte relación entre las lecturas de refractometría y la concentración de ST de la muestra de MCV, así como se encontró una alta correlación en los valores de cTS determinados en los grupos EC y ES, lo cual permitió validar la técnica refractométrica para la determinación de sólidos totales en muestras de MCV.

Los valores de refractividad encontrados en MCV de hembras del grupo sano fueron: 31.1 ± 10 , tomando valores de 28.8 ± 9 en fase folicular y 34 ± 9 en fase lútea. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos S y ES. Si se encontraron entre S y ES al compararlos con EC, resultados que

concuerdan con las determinaciones de ST y PT en los tres grupos, lo cual es lógico, ya que el índice de refracción se afecta por estos componentes. Un trabajo similar fue realizado por Van Schyndel y col., (2018) en el cual estudiaron en muestras de lavados uterinos la implementación de la Brix refractometría y se reportó una pobre performance de la técnica para el diagnóstico de ES (PMN N \geq 5%). Además, no encontraron asociación entre vacas positivas a ES con aumento de ST en lavados uterinos, resultados que concuerdan con lo encontrado para MCV en este trabajo. Esto podría deberse a que los cambios que sufre el endometrio en caso de ES, no generan una excesiva descamación tisular y producción de detritus que aumente en gran proporción los sólidos totales en las muestras.

Machado y col., (2012) midieron la densidad óptica en lavados uterinos de vacas con endometritis reportando buena precisión de la técnica (100% Se, 82.3% Esp para ES con CB > 18% PMN N) para ES y EC, proponiendo que la inflamación podría alterar la densidad óptica de la muestra debido a los exudados y desechos celulares. Los resultados de este trabajo no pueden compararse con los obtenidos, ya que se utilizaron diferentes técnicas y distintos puntos de corte (% PMN N).

Para la determinación de proteínas totales el método refractométrico presentó pobre concordancia. Esto podría deberse a que hay sustancias que producen interferencias en la medición y que pueden agregar cantidades de 0.5 a 1.0 g/dL (George, 2001). Ambas técnicas evaluadas para la determinación de proteínas totales; refractometría y tiras reactivas de orina, arrojaron valores más altos que los obtenidos por el método de referencia de Ácido Bicinconínico. Cheong y col., (2012) determinaron como punto de corte valores de tiras reactivas \geq +++ para proteínas, utilizando muestras de lavados uterinos para el diagnóstico de ES (Se 58.3%, Esp 55.8%). Si bien en este trabajo se utilizó muestras de moco cérvico-vaginal, las tiras no ofrecieron un resultado real de la concentración de proteínas totales, por lo cual no se podría confiar en la estimación.

El MCV posee componentes inorgánicos, entre ellos sales minerales que son las responsables de modular el volumen, la consistencia y la penetración de los espermatozoides (Macdonald, 1969a). En este ensayo, no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de Na⁺ y Mg²⁺ entre los grupos,

pero si se encontraron diferencias en la concentración de K^+ en hembras ES al compararlo con el grupo sano y EC, lo que resultó en una menor relación Na^+/K^+ . No se han reportados estudios del contenido iónico del MCV en vacas con endometritis subclínica, pero varios autores analizaron el comportamiento de los iones en moco de vacas al momento del celo o inseminación artificial; Bernardi y col., (2018) encontraron en muestras de MCV recolectadas en el momento de la IA mayores valores de Na^+ , menores de K^+ y menor relación Na^+/K^+ en vacas que no lograron la concepción en comparación con hembras preñadas. Por el contrario, otros autores determinaron incrementos de Na^+ y K^+ en vacas y búfalas que lograron la preñez (Bennur y col., 2004; Gohel y col., 2020). En muestras de hembras bovinas repetidoras también se encontraron valores menores o iguales de Na^+ y K^+ (Sharma y col., 1987; Siddiquee, 2006). En cuanto a la concentración de Mg^{2+} , Bernardi y col., (2018) hallaron valores más elevados en vacas vacías que en preñadas. Sin embargo, Gohel y col., (2020) no encontraron diferencias significativas entre vacas que lograron concebir con aquellas que no lo lograron. Las diferencias entre los distintos resultados de las concentraciones de electrolitos entre autores, podrían deberse a diversos factores que afectan la fertilidad del animal al momento del muestreo, que alteran o no la secreción de iones por el epitelio, entre ellos podría ser que la vaca curse con ES.

La hidratación del moco se encuentra relacionada con las modificaciones en el contenido iónico. Las células epiteliales que revisten el canal cervical presentan bombas de membrana (cotransportador $Na-K-Cl$, cotransportador Na^+/HCO_3^- , $ATPASA Na^+/K^+$, canal Cl^-/HCO_3^- , Canal Na^+ , Canal $Ca^{2+} Cl^-$) y acuaporinas, que intervienen en la regulación del equilibrio osmótico (Pluta y col., 2012). El Na^+ es uno de los principales cationes del medio extracelular y el K^+ del medio intracelular, la relación Na^+/K^+ intracelular óptima es 10-15:1, por lo cual igual valor o incluso mayor sería esperado encontrar en el medio extracelular (Bernardi y col., 2018). La reducción de la relación Na^+/K^+ en mucus de hembras con ES podría derivar alteraciones en; la hidratación y osmolalidad del mucus, así como en la membrana de los espermatozoides, que conllevaría a fallas reproductivas.

Se ha demostrado en diversas patologías, que la expresión de canales iónicos pueden ser inducido por citocinas, Zhou y col., (2001) reportaron que el canal

mCLCA3 (canal de cloruro activado por calcio) es inducido por citocinas Th2 como IL-4, IL-9 e IL-13. Otros estudios reportaron que TNF α e IFN δ produjeron inhibición o downregulation de las bombas Na⁺/K⁺, en modelos celulares de colitis inflamatoria y en pacientes humanos con enfermedad inflamatoria intestinal (Allgayer y col., 1988; Romero-Calvo, 2014), así como estudios realizados en hepatocitos incubados con IL-6 exhibieron una disminución del 55% de la actividad de la bomba, alterando el transporte de sales biliares (Green y col., 1994). Se han encontrado mayores niveles de citoquinas inflamatorias TNF- α , IL-6, IL-10 y de proteínas de fase aguda (amiloide sérico A y haptoglobina) en muestras de suero y lavados uterinos de hembras con endometritis subclínica al compararlas con hembras sanas (Brodzki y col., 2015). Ghasemi y col., (2012) encontraron un aumento de expresión citocinas (IL-8, IL-6, TNF- α) en muestras de *cytobrush* en vacas con ES. Los valores elevados de citocinas podrían causar el mal funcionamiento o la inhibición de la bomba ATPASA Na⁺/K⁺, lo que conllevaría a menor captación de K⁺ del medio extracelular, al igual que ocurre en otras enfermedades inflamatorias.

Al estudiar la interacción entre las variables, con la prueba de componentes principales y árboles de clasificación, se obtuvo un modelo estadístico que permitió categorizar a las hembras bovinas en el estatus sanitario uterino, según las características del MCV y *Cytobrush*.

Del análisis multivariado surgieron tres componentes principales que representaron el 63.35% de la varianza total. La CP1 se correlacionó fuertemente con elevada cantidad de sólidos totales y proteínas totales, por lo cual inherentemente con valores altos de refractividad, así como con rangos altos de esterasa leucocitaria, magnesio y negativamente con el porcentaje de agua. Se denominó **inflamación exudativa** ya que presenta características típicas de exudados. Se encontró una asociación entre las muestras que presentaban mayores valores de CP1 y aquellas que presentaron fondo tipo sucio en el extendido, así como con el estatus sanitario uterino EC. Es decir que, las muestras de MCV que tienen fondo sucio se asocian a valores más altos de PT, ST, R, Mg²⁺, menor % H₂O y mayor rango de actividad de esterasa leucocitaria que aquellas que tienen un fondo limpio. Estos datos refuerzan los resultados encontrados para el test del fondo de extendido para el diagnóstico de endometritis clínica, así como la asociación

entre el tipo de fondo con las características del MCV y la presencia de endometritis. La componente inflamación exudativa fue el predictor más relevante en la primera división de árboles, para dividir a las hembras en grupos con endometritis clínica o sin endometritis clínica.

La CP2 o componente **desbalance electrolítico**, presentó alta correlación con valores elevados de K^+ , pH, grado de cristalización y baja correlación con los valores de la relación Na^+/K^+ . Como se mencionó anteriormente, una alta concentración de K^+ en el medio extracelular y una alteración de la relación entre los iones puede desarrollar desequilibrios en la osmolalidad del medio y membranas celulares. El grado de cristalización de las muestras depende de la concentración de sales, por lo cual es de esperarse que se modifique de acuerdo al comportamiento de los iones. En este trabajo no se realizó una comparación del mismo según estatus sanitario uterino, ya que el fenómeno de cristalización depende del nivel de estrógenos circulantes en la hembra, por lo cual sería interesante a futuro compararlo en un mismo momento del ciclo y evaluar su comportamiento. La CP2 tomó valores más altos en hembras con ES en relación a hembras EC. Se comportó como el segundo predictor más importante para la segunda división de árboles de clasificación.

La CP3 o componente **inflamación celular** se correlacionó fuertemente con el % PMN N en el *cytobrush* y con una baja concentración de Na^+ . Esta componente tomó valores altos en muestras con fondo de extendido sucio y en hembras que presentan estatus sanitario uterino ES y EC. La CP3 representó el tercer predictor para la división. Las hembras que presentaron valores más elevados de desbalance electrolítico y de inflamación celular, se clasificaron como ES según los resultados de árboles de clasificación. Estos datos reforzaron los resultados obtenidos en el análisis univariado del MCV y permitieron analizar el comportamiento de las variables en forma conjunta.

La endometritis subclínica es una enfermedad en la cual hay inflamación con infiltración de PMN N en útero, pero no presenta exudados por vulva, por lo cual es de esperarse que el moco no presente las mismas propiedades que en vacas con endometritis clínicas, resultando en un menor punto de corte de la CP1, así como no

es de esperarse que comparta las características con vacas con estatus sanitario uterino sano. Podría decirse que se comporta como un "estado intermedio", en el cual el MCV presenta un pH más alcalino, desbalance electrolítico, mayor descamación, detritus y células inflamatorias que en el moco proveniente de vacas con estatus uterino sano, pero que no llega a presentar las características de vacas con EC.

8 CONCLUSIONES

De acuerdo a los objetivos propuestos y resultados experimentales, se concluye qué:

- ✓ La prevalencia de endometritis subclínica de la cuenca lechera de Santa Fe fue 35%, mayor a las registradas anteriormente.
- ✓ No se encontró relación estadísticamente significativa entre la turbidez del moco y la endometritis subclínica.
- ✓ La técnica de lectura de fondo de extendido de MCV arrojó alta sensibilidad para diagnóstico de EC, pero baja para ES. Sin embargo, la lectura del fondo se correlaciona con el % PMN N en el útero, lo cual aporta información valiosa para la evaluación reproductiva de la hembra.
- ✓ El MCV de vacas que cursaron con endometritis subclínica presentó pH más alcalino que el MCV de hembras con estatus uterino sanitario sano.
- ✓ La prueba de esterasa leucocitaria reveló alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de ES en muestras de MCV. Es un método rápido, fácil, barato y simple, que además otorga resultados confiables para medir pH.
- ✓ La concentración de sólidos totales, proteínas totales, Mg^{2+} , Na^{+} , porcentaje de agua y valores de refractividad del MCV no se modificaron en vacas con endometritis subclínica.

- ✓ La concentración de K^+ resultó mayor y la relación Na^+/K^+ menor, en MCV de hembras con endometritis subclínica, al compararlas con hembras con estatus uterino sanitario sano.

- ✓ En concordancia con la prueba de árboles de clasificación, una hembra bovina que presente valor menor a 1.205 del componente inflamación exudativa, valor de desequilibrio electrolítico superior a 0.759 y valor de grado de inflamación celular superior a 0.391, se podría clasificar en el grupo endometritis subclínica.

9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abd-ElHafeez, A. M., Amin, A. M. S., Ramadan, M. H., Helal, A., & Mohamed, M. Y. (2020). The most applicable physical properties of cervical mucus correlated with high pregnancy rate in egyptian cows under heat stress condition. *Adv. Anim. Vet. Sci*, 8(s2), 122-131.
2. Abusineina, M. E. (1962). A study of the fern-like crystalline patterns of the cervical and vaginal mucus of cattle. *Vet. Rec*, 74(22), 619–621.
3. Adams, G. P., Jaiswal, R., Singh, J., & Malhi, P. (2008). Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*, 69(1), 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.09.026>
4. Adams, G. P., Matteri, R. L., Kastelic, J. P., Ko, J. C., & Ginther, O. (1992). Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, 94(1), 177–188. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0940177>
5. Adnane, M., Kaidi, R., Hanzen, C., & England, G. C. (2017). Risk factors of clinical and subclinical endometritis in cattle: A review. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 41(1), 1–11. <https://doi.org/10.3906/vet-1603-63>
6. Adnane, M., Kelly, P., Chapwanya, A., Meade, K. G., & O'Farrelly, C. (2018a). Improved detection of biomarkers in cervico-vaginal mucus (CVM) from postpartum cattle. *BMC Veterinary Research*, 14(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1619-5>
7. Adnane, M., Meade, K. G., & O'Farrelly, C. (2018b). Cervico-vaginal mucus (CVM) – an accessible source of immunologically informative biomolecules. *Veterinary Research Communications*, 42(4), 255–263. <https://doi.org/10.1007/s11259-018-9734-0>
8. Allgayer, H., Kruis, W., Paumgartner, G., Wiebecke, B., Brown, L., & Erdmann,

- E. (1988). Inverse relationship between colonic (Na⁺⁺ K⁺)-ATPase activity and degree of mucosal inflammation in inflammatory bowel disease. *Digestive Diseases and Sciences*, 33(4), 417-422.
9. Asfar, A., Sofi, K. A., Bhat, M. A., Malik, A. A., & Malik, A. A. (2021). Leukocyte esterase reagent strips: Rapid, economical and reliable cow side test for subclinical endometritis. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 45(3), 540–546. <https://doi.org/10.3906/vet-2006-123>
 10. Baeck, J. M. (2012). Transición de la vaca lechera. Nuevos criterios nutricionales que desafían nuestros paradigmas. *Sitio Argentino de Producción Animal*, 11.
 11. 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(6), 714–723. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.12.005>
 12. Barnes, M., Kasimanickam, R., & Kasimanickam, V. (2023). Effect of subclinical endometritis and flunixin meglumine administration on pregnancy in embryo recipient beef cows. *Theriogenology*, 201, 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.02.020>
 13. Barrio M, Becerra J. J., Herradon P. G., Sebastian F., Fernandez M., Q. LA. (2014). Fertility in cows with endometritis diagnosed by cytology at day 30 postpartum. *12th In-Ternational Congress of the Spanish Association for Animal Reproduction (AERA) 16-18 Octubre 2014*. Alicante, España.
 14. Bedewy, R. B., & Rahawy, M. A. (2019). Comparative study for detection of subclinical endometritis in local cows. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 7(4), 289–294. <https://doi.org/10.17582/journal.aavs/2019/7.4.289.294>
 15. Benbia, S., Kalla, A., Yahia, M., Belhadi, K., & Zidani, A. (2011). Enzymes activity in bovine cervical mucus related to the time of ovulation and

- insemination. *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, 5, 664-666.
16. Bennur, P. C., Honnappagol, S. S., & Tandle, M. K. (2004). Effect of physico-chemical properties of cervico-vaginal mucus on fertility in cows. *Indian Veterinary Journal*, 81(9), 1069.
 17. Bernardi, S.F., Savia, C.L, De Paz, L.J., Rodriguez J. & Marini, P. (2018). Physical Properties and Ionic Concentration of the Bovine Cervical Mucus at the Moment of Inseminating: Spontaneous Estrous and Induced Estrous. *Journal of Veterinary Science & Technology*, 09(03), 2–5. <https://doi.org/10.4172/2157-7579.1000545>
 18. Bishnoi B.L., Vyas K.K., D. P. (1982). Spinnbarkeit and crystallization pattern of bovine cervical mucus during oestrus. Note. *Indian J Anim Sci*, 52(6), 438–440.
 19. Blom, E. (1969). Rapid refractometric determination of the content of total solids in bull seminal plasma. *Andrologia*, 1(2), 71–74. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1969.tb00527.x>
 20. Brodzki, P., Kostro, K., Krakowski, L., & Marczuk, J. (2015). Inflammatory cytokine and acute phase protein concentrations in the peripheral blood and uterine washings of cows with subclinical endometritis in the late postpartum period. *Veterinary Research Communications*, 39(2), 143–149. <https://doi.org/10.1007/s11259-015-9635-4>
 21. Carneiro, L. C., Ferreira, A. F., Padua, M., Saut, J. P., Ferraudo, A. S., & dos Santos, R. M. (2014). Incidence of subclinical endometritis and its effects on reproductive performance of crossbred dairy cows. *Tropical Animal Health and Production*, 46(8), 1435–1439. <https://doi.org/10.1007/s11250-014-0661-y>
 22. Carrillo, W. (2013). Lisozima: Actividad antibacteriana y alergenicidad. *Actual. nutr* , 314-326.

23. Castrillon Rivera, L. E., Palma Ramos, A., & Macín Cabrera, S. (2011). Innovative study on lactoferrin in periodontal disease. *Revista Odontológica Mexicana*, 15(4).
24. Cerutti, A., Chen, K., & Chorny, A. (2011). Immunoglobulin responses at the mucosal interface. *Annual review of immunology*, 29, 273-293.
25. Cheong, S. H., Nydam, D. V., Galvão, K. N., Crosier, B. M., & Gilbert, R. O. (2011). Cow-level and herd-level risk factors for subclinical endometritis in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 94(2), 762–770. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3439>
26. Cheong, S. H., Nydam, D. V., Galvão, K. N., Crosier, B. M., Ricci, A., Caixeta, L. S., & Gilbert, R. O. (2012). Use of reagent test strips for diagnosis of endometritis in dairy cows. *Theriogenology*, 77(5), 858–864. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.09.009>
27. Cieloswki, B., Vega, M., Bernardi, S. F., Marini, P. R. (2017). Prevalencia de endometritis subclínica y su relación con producción y reproducción en vacas lecheras. *Libro de resúmenes de la II Reunión Transdisciplinaria en Ciencias Agropecuarias. XVIII Jornada de Divulgación Técnico-Científicas de la Facultad de Cs. Veterinarias, UNR*. ISBN: 978-987-46406-2-8, 441-442.
28. Colazo, M. G., & Mapletoft, R. (2017). Fisiología del ciclo estral bovino. *Ciencia Veterinaria*, 16(2), 31-46. <https://doi.org/10.19137/cienvet20141623>
29. Cortés, M. E., González, F., & Vigil, P. (2014). Crystallization of Bovine Cervical Mucus at Oestrus: An Update. *Revista de Medicina Veterinaria*, (28), 103–116.
30. Cortés, M. E., Cabrera, D., López, R. I., & Vigil, P. (2016). Importancia del moco cervical en la fisiología reproductiva bovina. In *VI Congreso Internacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia: artículos in extenso*. Guayaquil: CIDE (pp. 78-95).

31. Couto, G. B., Vaillancourt, D. H., & Lefebvre, R. C. (2013). Comparison of a leukocyte esterase test with endometrial cytology for diagnosis of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology*, *79*(1), 103–107. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.09.014>
32. Curlin, M., & Bursac, D. (2013). Cervical mucus: From biochemical structure to clinical implications. *Frontiers in Bioscience - Scholar*, *5* (2), 507–515. <https://doi.org/10.2741/s386>
33. Curriá, M. I. (2010). LH y moco cervical en el reconocimiento de la fertilidad (Tesis Doctoral, Universidad católica de Argentina).
34. de la Sota, R. L. De, Madoz, L. V., Jaureguiberry, M., & Dominguez, G. (2014). Endometritis subclínica en vacas de tambo: diagnóstico, prevalencia e impacto sobre la eficiencia reproductiva. *Spermova*, *4*(2), 105–111.
35. Dellmann, H. (1994). *Histología Veterinaria*. S.A. Zaragoza (España): Acribia.
36. Drillich, M., Tesfaye, D., Rings, F., Schellander, K., Heuwieser, W., & Hoelker, M. (2012). Effects of polymorphonuclear neutrophile infiltration into the endometrial environment on embryonic development in superovulated cows. *Theriogenology*, *77*(3), 570–578. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.08.033>
37. Dubuc, J., Duffield, T. F., Leslie, K. E., Walton, J. S., & LeBlanc, S. J. (2010). Definitions and diagnosis of postpartum endometritis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *93*(11), 5225–5233. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3428>
38. Edmonson, A. J., Lean, I. J., Weaver, L. D., Farver, T., & Webster, G. (1989). A Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, *72*(1), 68–78. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(89\)79081-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79081-0)
39. Eggert-Kruse, W., Kohler, A., Rohr, G., & Runnebaum, B. (1993). The pH as an important determinant of sperm-mucus interaction. *Fertility and Sterility*, *59*(3), 617–628. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)55810-5](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)55810-5)

40. Fernandez-Sanchez, F. I., Barrio-Lopez, M., Quintela-Arias, L. A., Becerra-Gonzalez, J. J., Peña-Martinez, A. I., Martinez-Bello, D., ... Perez-Marín, C. C. (2014). Use of endometrial cytology and metabolic profiles for selection of embryo donor cows. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 12(3), 664–671. <https://doi.org/10.5424/sjar/2014123-4948>
41. Földi, J., Kulcsar, M., Pecsí, A., Huyghe, B., De Sa, C., Lohuis, J. A. C. M., ... & Huszenicza, G. (2006). Bacterial complications of postpartum uterine involution in cattle. *Animal reproduction science*, 96(3-4), 265-281.
42. Foote, R. H. (1970). Estimation of total solids in bull seminal plasma by refractometry. *Journal of animal science*, 30(4), 561-564.
43. Franco, J., & Uribe Velásquez, L. F. (2012). Hormonas reproductivas de importancia veterinaria en hembras domésticas rumiantes. *Biosalud*, 11(1), 41–56.
44. Galvão, K. N., Frajblat, M., Brittin, S. B., Butler, W. R., Guard, C. L., & Gilbert, R. O. (2009). Effect of prostaglandin F₂α on subclinical endometritis and fertility in dairy cows. *Journal of dairy science*, 92(10), 4906-4913.
45. Gázquez Ortiz, A., & Blanco Rodríguez, A. (2004). *Tratado de Histología Veterinaria*.
46. George, J. W. (2001). The Usefulness and Limitations of Hand-held Refractometers in Veterinary Laboratory Medicine: An Historical and Technical Review. *Veterinary Clinical Pathology*, 30(4), 201–210. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2001.tb00432.x>
47. Ghasemi, F., Gonzalez-Cano, P., Griebel, P. J., & Palmer, C. (2012). Proinflammatory cytokine gene expression in endometrial cytobrush samples harvested from cows with and without subclinical endometritis. *Theriogenology*, 78(7), 1538–1547. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.06.022>
48. Gibbons, R. A. (1959). Chemical properties of two mucoids from bovine

- cervical mucin. *Biochemical Journal*, 73(2), 209.
49. Gilbert, R. O. (2016). Management of Reproductive Disease in Dairy Cows. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 32(2), 387–410. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2016.01.009>
50. 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(9), 1879–1888. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.04.022>
51. Glazar, A. I., Mullen, S. F., Liu, J., Benson, J. D., Critser, J. K., Squires, E. L., & Graham, J. K. (2009). Osmotic tolerance limits and membrane permeability characteristics of stallion spermatozoa treated with cholesterol. *Cryobiology*, 59(2), 201–206. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.07.009>
52. Gohel, M. M., Kavani, F. S., Dhimi, A. J., & Hadiya, K. K. (2020). Electrolytes Profile of Estrual Mucus of Gir Cows with Reference to Body Condition Score and Fertility. *The Indian Journal of Veterinary Sciences & Biotechnology*, 16(1), 07–10. <https://doi.org/10.21887/ijvsbt.16.1.2>
53. Green, R. M., Whiting, J. F., Rosenbluth, A. B., Beier, D., & Gollan, J. L. (1994). Interleukin-6 inhibits hepatocyte taurocholate uptake and sodium-potassium-adenosinetriphosphatase activity. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 267(6), G1094-G1100. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1994.267.6.g1094>
54. Hafez, E. S. E., & Hafez, B. (Eds.). (2013). *Reproduction in farm animals*. John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781119265306.ch1>
55. 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. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 113(1–2), 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.03.022>
56. Heidarpour, M., Mohri, M., Fallah-Rad, A. H., Shahreza, F. D., & Mohammadi,

- M. (2012). Acute-phase protein concentration and metabolic status affect the outcome of treatment in cows with clinical and subclinical endometritis. *Veterinary Record*, 171(9), 219-219.
57. Holy, L. (1983). *Bases biológicas de la reproducción bovina*. Mexico D.F.: Diana S.A.
58. Kadivar, A., Ahmadi, M. R., & Vatankhah, M. (2014). Associations of prepartum body condition score with occurrence of clinical endometritis and resumption of postpartum ovarian activity in dairy cattle. *Tropical Animal Health and Production*, 46(1), 121–126. <https://doi.org/10.1007/s11250-013-0461-9>
59. 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(1–2), 9–23. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.03.001>
60. Kasimanickam, Ramanathan, 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*, 46(3), 255–259.
61. Kim, I. H., & Kang, H. G. (2003). Risk factors for postpartum endometritis and the effect of endometritis on reproductive performance in dairy cows in Korea. *Journal of Reproduction and Development*, 49(6), 485–491. <https://doi.org/10.1262/jrd.49.485>
62. Kimura, K., Goff, J. P., & Kehrl, M. E. (1999). Effects of the presence of the mammary gland on expression of neutrophil adhesion molecules and myeloperoxidase activity in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 82(11), 2385–2392. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75489-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75489-5)

63. LeBlanc, S. J., Duffield, T. F., Leslie, K. E., Bateman, K. G., Keefe, G. P., Walton, J. S., & Johnson, W. H. (2002). Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *85*(9), 2223–2236.
64. LeBlanc, S. J. (2008). Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: A review. *Veterinary Journal*, *176*(1), 102–114. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74302-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74302-6)
65. Levay, P. F., & Viljoen, M. (1995). Lactoferrin: a general review. *Haematologica*, *80*(3), 252-267.
66. Lietaer, L., Pascottini, O. B., Heirbaut, S., Demeyere, K., Vandaele, L., Meyer, E., ... & Opsomer, G. (2023). Viability and function dynamics of circulating versus endometrial polymorphonuclear leukocytes in postpartum dairy cows with subclinical or clinical endometritis. *Journal of Dairy Science*. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22471>
67. Lim, H.J., Son, J.K., Yoon, H.B., Baek, K.S., Kim, T., Jung, Y.S., & Kwon, E.G. (2014). Physical Properties of Estrus Mucus in Relation to Conception Rates in Dairy Cattle. *Journal of Embryo Transfer*, *29*(2), 157–161. <https://doi.org/10.12750/jet.2014.29.2.157>
68. Lopdell, T., Berg, M. C., Green, M. P., & Back, P. J. (2011). Effect of sub-clinical uterine infection on plasma aminoacid concentrations in early lactation dairy cows. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, *71*, 291–295.
69. Macdonald, R. R. (1969a). Cyclic changes in cervical mucus. 2. The role of saline. *Obstetrics and Gynecology of the British Commonwealth*, *76*(12), 1094-1099.
70. Macdonald, R. R. (1969b). Cyclic Changes in Cervical Mucus. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, *76*(12), 1090–1099. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.1969.tb05790.x>

71. Machado, V. S., Knauer, W. A., Bicalho, M. L. S., Oikonomou, G., Gilbert, R. O., & Bicalho, R. C. (2012). A novel diagnostic technique to determine uterine health of Holstein cows at 35 days postpartum. *Journal of Dairy Science*, *95*(3), 1349–1357. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4867>
72. Madoz, L.V., Ploentzke, J., Albarracin, D., Mejia, M., Drillich, M., Heuwieser, W., de La Sota, R. L. (2008). Prevalence of clinical and subclinical endometritis in dairy cows and the impact on reproductive performance. In 16th International Congress on Animal Reproduction, Budapest, Hungary (Vol. 51)
73. Madoz, L. V. (2012). Endometritis subclínica en vacas de tambo: diagnóstico, prevalencia e impacto sobre la eficiencia reproductiva (Tesis Doctoral, Universidad Nacional de La Plata).
74. Madoz, L. V., Giuliadori, M. J., Jaureguiberry, M., Plöntzke, J., Drillich, M., & de la Sota, R. L. (2013). The relationship between endometrial cytology during estrous cycle and cutoff points for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *96*(7), 4333–4339. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6269>
75. Marini P.R, & Oyarzabal, M. I. (2002). Patrones de producción en vacas lecheras. II Descripción de la vaca media y estimación de los ingresos según categorías de producción. *Revista Argentina de Producción Animal*, *22*(1), 47–60.
76. Marschke, R. J., & Kitchen, B. J. (1985). Detection of Bovine Mastitis by Bromothymol Blue pH Indicator Test. *Journal of Dairy Science*, *68*(5), 1263–1269. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(85\)80955-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(85)80955-3)
77. Mattei, B., Lira, R. B., Perez, K. R., & Riske, K. A. (2017). Membrane permeabilization induced by Triton X-100: The role of membrane phase state and edge tension. *Chemistry and Physics of Lipids*, *202*, 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2016.11.009>

78. Modi, L. C., Suthar, B. N., Nakhashi, H. C., Sharma, V. K., & Panchasara, H. H. (2011). Physical Characteristics of Estrual Cervical Mucus and conception rate in Repeat Breeder Kankrej Cattle. *International Journal for Agro Veterinary and Medical Sciences*, 5(4), 416. <https://doi.org/10.5455/ijavms.20110801094641>
79. Motta Delgado P.A. , Ramos, C., González, S., & Castro, R. (2011). Follicular dynamics in the reproductive life of female livestock. *Veterinaria y Zootecnia*, 5(2), 88–99.
80. Odeblad, E. (1983). The biophysical properties of the cervical-vaginal secretions. *International Review of Natural Family Planning*, Vol. 7, pp. 1–56.
81. Odeblad, E. (1977). Physical properties of cervical mucus. in “Mucus in Health and disease”, 217–218.
82. Ospina, P. A., Nydam, D. V., Stokol, T., & Overton, T. R. (2010). Associations of elevated nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate concentrations with early lactation reproductive performance and milk production in transition dairy cattle in the northeastern United States. *Journal of Dairy Science*, 93(4), 1596–1603. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2852>
83. Palmer, C. (2008). Endometritis en vacas lecheras. *Jornadas de Actualización En Biotecnologías de La Reproducción En Bovinos*, 10(37), 1–3.
84. Pascottini, O. B., Dini, P., Hostens, M., Ducatelle, R., & Opsomer, G. (2015). A novel cytologic sampling technique to diagnose subclinical endometritis and comparison of staining methods for endometrial cytology samples in dairy cows. *Theriogenology*, 84(8), 1438–1446. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.032>
85. Plöntzke, J., Madoz, L. V, de la Sota, R. L. De, Drillich, M., & Heuwieser, W. (2010). Subclinical endometritis and its impact on reproductive performance in grazing dairy cattle in Argentina. *Animal Reproduction Science*, 122 (1–2),

52–57. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.07.006>

86. Pluta, K., McGettigan, P. A., Reid, C. J., Browne, J. A., Irwin, J. A., Tharmalingam, T., ... Carrington, S. D. (2012). Molecular aspects of mucin biosynthesis and mucus formation in the bovine cervix during the peri-estrous period. *Physiological Genomics*, *44*(24), 1165–1178. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00088.2012>
87. Qayyum, A., Khan, J. A., Hussain, R., Avais, M., Ahmad, N., & Khan, M. S. (2016). Investigation of milk and blood serum biochemical profile as an indicator of sub-clinical mastitis in Cholistani cattle. *Pak. Vet. J*, *36*(3), 275-279.
88. Quintela, L. A., Vigo, M., Becerra, J. J., Barrio, M., Peña, A. I., & Herradón, P. G. (2017). Endometritis subclínica en ganado vacuno lechero: etiopatogenia y diagnóstico. Revisión Bibliográfica. *ITEA, Información Técnica Económica Agraria: Revista de La Asociación Interprofesional Para El Desarrollo Agrario (AIDA)*, *113*(3), 250-266. <https://doi.org/10.12706/itea.2017.016>
89. Rao, K. B., Roberts, T. K., Masson, P. L., & Heremans, J. F. (1973). Lactoferrin, a major soluble protein of bovine oestrous cervical mucus. *Reproduction*, *32*(1), 89-92.
90. Rinaudo, A., Bernardi, S., & Marini, P. (2011). Prevalencia de endometritis clínica y subclínica en vacas lechera en postparto en un sistema intensivo estabulado. *REVISTA FAVE*, *10*(2), 59–63. <https://doi.org/10.14409/favecv.v10i2.1541>
91. Rinaudo, A., Bernardi, S. F., & Marini, P. R. (2017). Relation Between Subclinical Endometritis and Reproductive Efficiency in Dairy Cows in Argentina. *Journal of Veterinary Science & Technology*, *08*(06), 1–4. <https://doi.org/10.4172/2157-7579.1000494>
92. Rinaudo, A. (2012). Endometritis subclínica en vacas lecheras: diagnóstico, tratamiento e incidencia productiva y reproductiva. (Tesis Doctoral,

Universidad Nacional de Rosario).

93. Rippe, A. C. (2009). El Ciclo estrol. *Dairy Cattle Reproduction Conference*, 111–116.
94. Roche, J. R., Friggens, N. C., Kay, J. K., Fisher, M. W., Stafford, K. J., & Berry, D. P. (2009). Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. *Journal of Dairy Science*, 92(12), 5769–5801. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2431>
95. Rodríguez, J. (2018). El uso del refractómetro. Clínico Veterinario-MANUAL.
96. Romero-Calvo, I. (2014). *Modulation of ion transport in inflammatory bowel diseases: regulatory targets*. Universidad de Granada.
97. Ross, M. H., & Pawlina, W. (2016). *Histología: Texto y Atlas (7.ª, Vol. 1999; W. Kluwer, Ed.)*. Barcelona.
98. Roy-García, I., Rivas-Ruiz, R., Pérez- Rodríguez, M., & Palacios-Cruz, L. (2019). Correlación: No toda correlación implica causalidad. *Revista Alergia México*, 66(3), 354–360.
99. Runciman, D. J., Anderson, G. A., & Malmo, J. (2009). Comparison of two methods of detecting purulent vaginal discharge in postpartum dairy cows and effect of intrauterine cephalosporin on reproductive performance. *Australian Veterinary Journal*, 87(9), 369–378. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2009.00469.x>
100. Santos, N. R. (2006). The use of leukocyte esterase reagent strips for diagnosis of subclinical endometritis in dairy cows. *Theriogenology*, 66, 666–667.
101. Sartorelli, P., Paltrinieri, S., & Comazzi, S. (2000). Non-specific Immunity and Ketone Bodies. II: In Vitro Studies on Adherence and Superoxide Anion Production in Ovine Neutrophils. *Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine*, 47(1), 1–8.

<https://doi.org/10.1046/j.1439-0442.2000.00253.x>

102. Savia, C. L., Osorio, J. S., Rodríguez, J. V., Guibert, E. E., & Rinaudo, A. (2021). A simple and reliable refractometric method to determine the total solids concentration of the cervico-vaginal bovine mucus samples. *Heliyon*, 7(5), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07010>
103. Savia C. L., Reátegui J., Marini P. R., Bernardi S. (2016). Relación entre características físicas y contenido iónico del moco cervical con el estado de preñez al inseminar vaquillonas a celo detectado. *Spermova*, 6(2), 153–158. <https://doi.org/10.18548/aspe/0004.14>
104. Schumacher, G. F. (1970). Biochemistry of cervical mucus. *Fertility and Sterility*, 21(10), 697–705. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)37800-1](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)37800-1)
105. Seddon, A. M., Curnow, P., & Booth, P. J. (2004). Membrane proteins, lipids and detergents: Not just a soap opera. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1666(1–2), 105–117. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.04.011>
106. Senosy, W., & Osawa, T. (2018). Association among calving season and measures of energy status, resumption of ovulation and subclinical endometritis in early lactating dairy cows. *Animal Reproduction (AR)*, 10(1), 24–31.
107. Sharma, V. K., & Tripathi, S. S. (1987). Physio-chemical properties of cervical mucus in relation to conception in normal and repeat breeding cross bred cows. *Ind. J. Anim. Repro*, 8, 43–45.
108. Sheldon, I. M., Cronin, J., Goetze, L., Donofrio, G., & Schuberth, H. J. (2009). Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biology of Reproduction*, 81(6), 1025–1032. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.077370>

109. Sheldon, I. M., Lewis, G. S., LeBlanc, S., & Gilbert, R. O. (2006). Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology*, *65*(8), 1516–1530. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.08.021>
110. Sheldon, I. M., Williams, E. J., Miller, A. N. A., Nash, D. M., & Herath, S. (2008). Uterine diseases in cattle after parturition. *Veterinary Journal*, *176*(1), 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.031>
111. Siddiquee, G. M. (2006). Association of some biochemical attributes of estrual cervico-vaginal mucus with the fertility status of crossbred cows. *Indian Journal of Field Veterinarians*, *2*, 8–10.
112. Siregar, T. N., Armansyah, T., Panjaitan, B., Gholib, G., Herrialfian, H., Sutriana, A., Abidin, Z., Reynaldi, M. A., Razak, F., Artaliani Y., Yuswar, Y. (2019). Changes in cervical mucus as an indicator of fertility in Aceh Cattle. *Adv. Anim. Vet. Sci*, *7*(4), 306-314.
113. Tsiligianni, T. H., Karagiannidis, A., Brikas, P., & Saratsis, P. H. (2000). Relationship between certain physical properties of cervical mucus and fertility in cows. *DTW. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, *107*(1), 28–31.
114. Tsiligianni, T. H., Karagiannidis, A., Brikas, P., & Saratsis, P. H. (2001a). Physical properties of bovine cervical mucus during normal and induced (progesterone and/or PGF2 α) estrus. *Theriogenology*, *55*(2), 629–640. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00431-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00431-9)
115. Tsiligianni, T. H., Karagiannidis, A., Brikas, P., & Saratsis, P. H. (2001b). Chemical properties of bovine cervical mucus during normal estrus and estrus induced by progesterone and/or PGF2 α . *Theriogenology*, *56*(1), 41–50. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00541-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00541-6)
116. Tsiligianni, T. H., Karagiannidis, A., Roubies, N., Saratsis, P., & Brikas, P. (2002). Concentration of calcium, zinc, magnesium, potassium and sodium in the bovine cervical mucus during normal oestrus and oestrus induced by progesterone and/or PGF2 α . *Reproduction, Fertility and Development*, *14*(7),

427–431.

117. Tsiligianni, T. H., Karagiannidis, A., Saratsis, P., & Brikas, P. H. (2003). Enzyme activity in bovine cervical mucus during spontaneous and induced estrus. *Canadian Journal of Veterinary Research*, *67*(3), 189–193.
118. Van Raemdonck, G. A., Tjalma, W. A., Coen, E. P., Depuydt, C. E., & Van Ostade, X. W. (2014). Identification of protein biomarkers for cervical cancer using human cervicovaginal fluid. *PloS one*, *9*(9), e106488.
119. Van Schyndel, S. J., Bogado Pascottini, O., & LeBlanc, S. J. (2018). Comparison of cow-side diagnostic techniques for subclinical endometritis in dairy cows. *Theriogenology*, *120*, 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.08.001>
120. Vigil, P., Toro, A., & Godoy, A. (2008). Physiological action of oestradiol on the acrosome reaction in human spermatozoa. *Andrologia*, *40*(3), 146–151. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2007.00814.x>
121. Wagener, K., Gabler, C., & Drillich, M. (2017). A review of the ongoing discussion about definition, diagnosis and pathomechanism of subclinical endometritis in dairy cows. *Theriogenology*, *94*, 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.02.005>
122. Zavy, M. T., Clark, W. R., Sharp, D. C., Michael Roberts, R., & Bazer, F. W. (1982). Comparison of glucose, fructose, ascorbic acid and glucosephosphate isomerase enzymatic activity in uterine flushings from nonpregnant and pregnant goats and pony mares. *Biology of Reproduction*, *27*(5), 1147-1158. <https://doi.org/10.1095/biolreprod27.5.1147>
123. Zegels, G., Van Raemdonck, G. A., Tjalma, W. A., & Van Ostade, X. W. (2010). Use of cervicovaginal fluid for the identification of biomarkers for pathologies of the female genital tract. *Proteome science*, *8*, 1-23.
124. Zhou, Y., Dong, Q., Louahed, J., Dragwa, C., Savio, D., Huang, M., Weiss C., Tomer Y., McLane M.P., Nicolaidis N.C., Levitt, R. C. (2001).

Characterization of a calcium-activated chloride channel as a shared target of Th2 cytokine pathways and its potential involvement in asthma. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 25(4), 486–491. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.25.4.4578>