



Biópsias endometriais seriadas em vacas Nelore (*Bos taurus indicus*) durante o ciclo estral

Repeat endometrial biopsies in Nelore (Bos taurus indicus) cows during estrous cycle

R.R.D. Maziero^{1,3}, M.C.C. Mattos¹, L.B.C. Teixeira², I. Martin¹, J.C.P. Ferreira¹

¹Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ/Unesp, Botucatu, SP, Brasil.

²Department of Pathobiological Sciences, University of Wisconsin-Madison, Madison, WI, USA.

³Correspondência rosiamaziero@yahoo.com.br.

Resumo

Avaliaram-se as alterações histológicas endometriais consequentes da colheita repetida de fragmentos uterinos de vacas Nelore (*Bos taurus indicus*) durante o ciclo estral. Foram utilizadas 16 vacas, adultas, com o ciclo estral sincronizado. As amostras de endométrio foram colhidas no D0 (dia zero; dia da ovulação), D5 (dia cinco), D9 (dia nove) e D13 (dia 13) do ciclo. Durante as colheitas, foram avaliadas, pela ultrassonografia transretal, a função ovariana e a uterina de todos os animais. O infiltrado mononuclear foi predominante, porém sua intensidade não variou ao longo do ciclo estral, não caracterizando uma consequência direta das biópsias seriadas ($P > 0,05$). A intensidade de infiltrado polimorfonuclear variou entre as colheitas, sendo ausente na primeira e na última amostra ($P < 0,05$). Assim, pôde-se concluir que a biópsia endometrial em vacas é uma técnica adequada para a avaliação da higidez uterina.

Palavras-chave: biópsia, bovino, endométrio, Nelore, seriada.

Abstract

Endometrial histological alterations were evaluated from repeated collection of uterine samples in Nelore (Bos taurus indicus) during the estrous cycle. Sixteen adult cows with a synchronized estrous cycle were used. The endometrial samples were collected in D0 (day zero; ovulation day), D5 (day five), D9 (day nine) and D13 (day thirteen) of the estrous cycle. Before the samples collections, we evaluated the ovary and the uterus by transrectal ultrasonography in all the animals. The mononuclear infiltrate was predominant, however their intensity wasn't ranged throughout the estrous cycle, isn't representing a direct consequence of the biopsies ($P > 0.05$). Intensity of polymorphonuclear infiltrate varied between harvests, being absent in the first and last sample ($P < 0.05$). So, we concluded that bovine endometrial biopsy is an adequate technique to evaluate uterine health.

Keywords: biopsy, bovine, endometrium, Nelore, repeat.

Introdução

Um ambiente uterino saudável é fundamental para a fertilidade bovina, pois o endométrio possui um papel crítico na viabilidade e no desenvolvimento do embrião. Problemas após o parto, como retenção de placenta e infecções uterinas, podem resultar em reações inflamatórias, fibrose periglandular e alterações nas glândulas e nos vasos uterinos (Barbosa, 2000).

Desse modo, a endometrite é definida como uma inflamação do endométrio, a qual leva à deficiência na involução uterina, sendo os principais agentes patológicos isolados o *Arcanobacterium pyogenis* e a *Escherichia coli* (Lewis et al., 2003). Os neutrófilos constituem a primeira linha de defesa na ocorrência de organismos patogênicos, resultando em um aumento significativo na população de polimorfonucleares no lúmen uterino.

Diferentes técnicas de diagnóstico, como palpação uterina transretal, exame vaginoscópico, cultura de fluido uterino, citologia e a biópsia uterina, contribuem para o correto diagnóstico e determinam melhores opções de tratamento para tal enfermidade (Kasimanickam et al., 2004). Entre esses, o método mais comum para o diagnóstico da endometrite é a palpação transretal do útero, porém trata-se de uma avaliação subjetiva que acarreta falhas devido à variabilidade na involução uterina ao longo do ciclo estral (Leblanc et al., 2002; Gilbert et al., 2005). Já a biópsia endometrial tem se mostrado eficaz no diagnóstico desta enfermidade por se tratar de um método capaz de gerar extensos dados quantitativos da atividade uterina desses animais (Bonnett et al., 1991; Chapwanya et al., 2010).

Por definição, a biópsia reside na avaliação histológica do endométrio, permitindo prognosticar sobre o potencial reprodutivo da fêmea, bem como orientar o tratamento e o manejo reprodutivo. Possibilita também, caracterizar variações histológicas do endométrio decorrentes das estações do ano, ou seja, da atividade ovariana (anestro, por exemplo), observar alterações de natureza inflamatória e/ou degenerativas (Martins et al., 2002).



Com relação à avaliação das amostras obtidas, a resposta inflamatória pode ser aguda ou crônica; ocasionalmente, pode-se verificar um processo crônico com uma reação aguda superposta. Nas reações agudas, predominam neutrófilos no estrato compacto e/ou epitélio luminal. Já a inflamação crônica é caracterizada pela infiltração de linfócitos. A reação crônica geralmente envolve o estrato compacto e o estrato esponjoso, e a infiltração pode ser focal, difusa ou disseminada. A presença de plasmócitos é indicativa de estímulo antigênico contínuo e prolongado (Martins et al., 2002).

Pesquisadores da área de reprodução de bovinos têm sido relutantes em explorar a técnica de biópsia endometrial, pois autores sugeriram que esse procedimento pode comprometer a fertilidade (perceptível no comportamento de estro) da vaca ao induzir patologia uterina (Zaayer e van der Horst, 1986). Além disso, propuseram que somente a avaliação clínica fornece informações adequadas sobre a fertilidade desses animais, visto que a biópsia endometrial é considerada uma técnica de difícil realização e que causa riscos, ao mesmo tempo em que exige conhecimentos para a análise posterior das amostras histológicas. No entanto, a técnica tem potencial para desempenhar um papel-chave na avaliação da saúde do endométrio, ao investigar processos fisiológicos ou patológicos (Chapwanya et al., 2010).

Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar as respostas histológicas e morfológicas endometriais consequentes à colheita repetida de fragmentos uterinos de vacas Nelore (*Bos taurus indicus*) durante o ciclo estral.

Material e Métodos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho,” Campus de Botucatu.

Foram utilizadas 16 vacas Nelore, PO, adultas, com idades entre três e 14 anos ($6,6 \pm 0,81$) e escore corporal igual ou superior a 3 (escala de 0 a 5; Wildman et al., 1982), provenientes do rebanho da Fazenda Experimental São Manuel, FMVZ/Unesp, São Manuel, SP. Todas as fêmeas foram mantidas em regime de estabulação parcial, recebendo feno de alfafa, farelo de milho, sal mineral proteinado e água *ad libitum*.

Os animais foram submetidos a exame ginecológico diário, sendo aqueles com ciclos regulares submetidos ao seguinte protocolo de sincronização do estro: GnRH (25 μ g de lecirelina (Gestran Plus - Tecnopec) - IM) e sete dias mais tarde, PGF 2α (0,150 mg de D+cloprostenol (Preloban, Intervet International B.V., Curitiba, Brasil) - IM).

Os animais foram avaliados diariamente por palpação e ultrassonografia transretal (Aloka (Aloka Co. Ltda., Tokyo, Japan) SSD 500, transdutor de 5,0 MHz) depois de finalizado o protocolo de sincronização, a detecção da ovulação subsequente, até a confirmação de uma nova ovulação (um ciclo estral completo). Após a confirmação da ovulação pós-sincronização, considerada o dia zero do ciclo estral, foram obtidas amostras de endométrio uterino em dias pré-determinados do ciclo estral, dia zero - D0 (dia da ovulação), dia cinco - D5, dia nove - D9, dia 13 - D13 e dia 19 - D19, com o auxílio de uma pinça Yomann, sempre no corno contralateral ao corpo lúteo. Para se evitar qualquer interferência da biópsia anterior, os aspectos dorsal, lateral, medial e ventral do corno uterino foram utilizados, evitando-se colheitas repetidas do mesmo local.

Todas as pinças utilizadas eram lavadas diariamente em água corrente e com sabão neutro, secas em estufa convencional e, posteriormente, autoclavadas. Antes da sua utilização, a pinça era mantida submersa em álcool 70%. No momento da colheita, procedia-se a uma limpeza das regiões perineal e vulvar do animal com papel-toalha. Após a colheita, o fragmento uterino era lavado em solução fisiológica, acondicionado em cassete plástico para a inclusão, identificado com o número do animal, dia do ciclo estral e data da colheita.

Durante a colheita de fragmentos uterinos, avaliaram-se a presença e as características do muco vaginal, e este foi classificado em: claro ou translúcido, mucopurulento, purulento e sanguinolento.

Os fragmentos uterinos foram fixados em formol tamponado 10% durante 24 horas e, posteriormente, mantidos em álcool 70% até o momento de inclusão em parafina, realizada no Laboratório de Histopatologia do Serviço de Patologia Veterinária do Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ/Unesp, Botucatu.

Após a inclusão, cortes de 3 μ M foram obtidos, montados em lâminas com extremidade fosca e corados em hematoxilina – eosina (HE). Desta forma, realizou-se a leitura das amostras histológicas em microscópio óptico de 400X, e estas foram classificadas, de acordo com o infiltrado inflamatório encontrado, em:

- tipo de infiltrado: mononuclear ou polimorfonuclear;
- intensidade de infiltrado inflamatório: escore de 0 a 4, em que 0- infiltrado ausente; 2- infiltrado observado em 25 a 50% da área do fragmento; 3- 50 a 75% da área do fragmento e 4- 75 a 100% da área do fragmento.

Assim, foram contados cinco campos, divididos em 0,5 μ M, num total de 200 células contadas por dia de tratamento. Realizou-se a leitura de 72 lâminas de amostras histológicas endometriais. Deste total, 10 lâminas não continham material para a realização da leitura ($n = 62$).

Para as variáveis de escore da intensidade e o tipo de infiltrado inflamatório, foram determinadas a média e o desvio-padrão. Para a comparação entre os grupos de colheita, o tipo de infiltrado inflamatório e o escore de intensidade, foi utilizada a análise de variância ANOVA, e a comparação entre as médias foi

realizada pelo teste de Tukey, do pacote SAS 9.1. Os valores foram considerados estatisticamente significativos com $P < 0,05$.

Resultados

Os animais apresentaram intervalo interovulatório médio de $20,5 \pm 0,46$ dias, sendo confirmado pela ultrassonografia diária do aparelho genital. O momento médio das ovulações foi $6,00 \pm 2,61$ dias (variando entre três e 13 dias) após a administração da prostaglandina.

De todas as lâminas avaliadas, 98,4% ($n = 61$) apresentavam algum grau de alteração inflamatória.

Os resultados médios do escore da intensidade e o tipo de infiltrado inflamatório estão apresentados na Fig. 1. Este infiltrado foi predominante nas amostras, e sua intensidade não variou durante as colheitas (variação de 0,73 a 1,44).

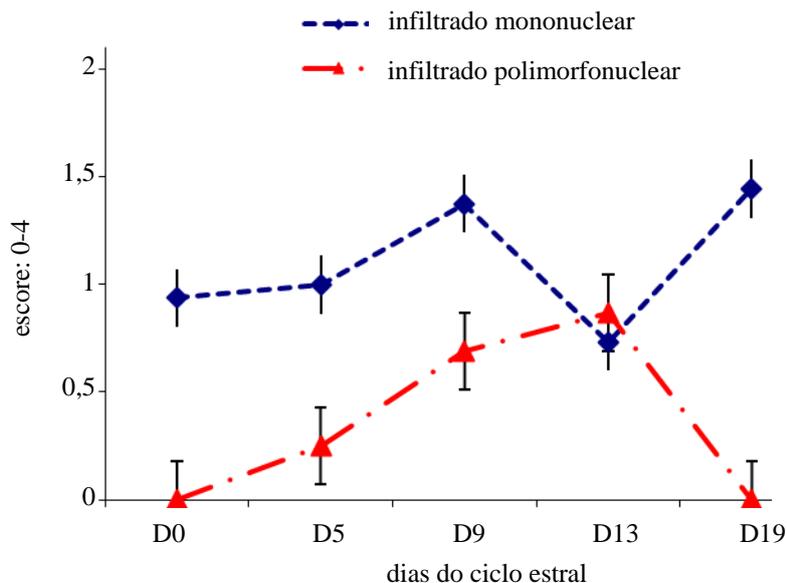


Figura 1. Valores médios e erro-padrão em escore (0-4) para a intensidade de infiltrado inflamatório mono e polimorfonuclear no endométrio uterino.

Foi observada ausência do infiltrado polimorfonuclear (Fig. 1 e 2) no dia zero, a partir do dia cinco houve um aumento gradativo desse infiltrado celular, com o pico no dia D13 (variação de 0 a 0,86). No dia 19 do ciclo estral, não foi possível observar a presença dessas células. Esses achados diferiram estatisticamente para a intensidade do infiltrado inflamatório polimorfonuclear ao longo do ciclo estral nos tecidos avaliados (epitélio superficial, glandular, vascular e estroma; $P < 0,05$).

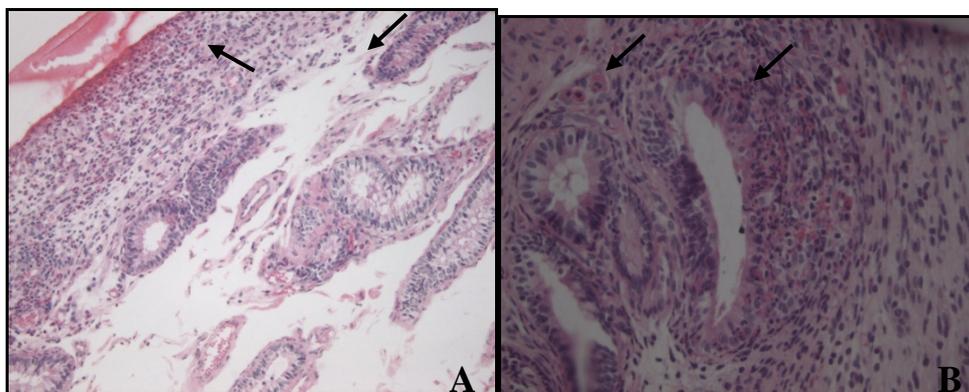


Figura 2. Fotomicrografia do endométrio bovino. A: infiltrado polimorfonuclear, difuso, escore 2, HE, objetiva 20X (dia nove; D9). B: infiltrado polimorfonuclear, periglandular, escore 2, HE, objetiva 40X (dia 13; D13).

Embora diferentes escores de infiltrado mononuclear tenham sido observados (Fig. 3), não houve diferença desse infiltrado ao longo do ciclo estral entre os tecidos avaliados (epitélio superficial, glandular, vascular e estroma) ($P > 0,05$).

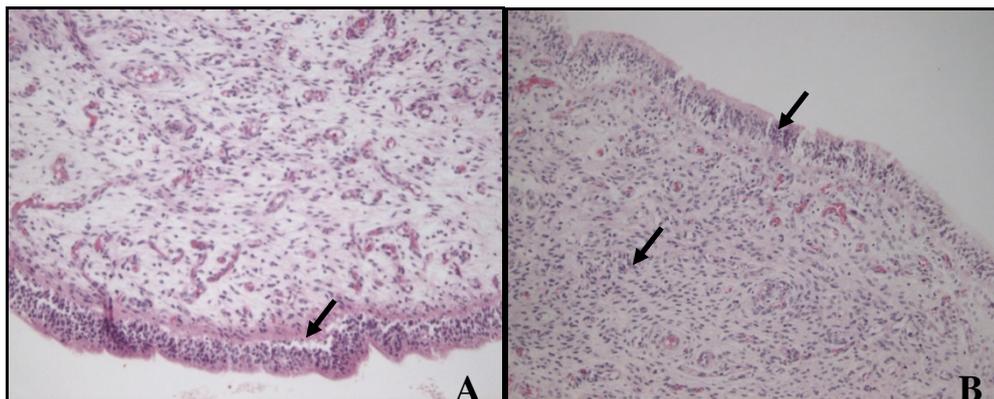


Figura 3. Fotomicrografia do endométrio bovino. A: infiltrado mononuclear, superficial, escore 2, HE, objetiva 20X (dia nove; D9). B: infiltrado mononuclear, difuso, escore 2, HE, objetiva 20X (dia cinco; D5).

Durante a colheita de fragmentos uterinos, avaliaram-se a presença e as características do muco vaginal. Das 16 vacas selecionadas para o experimento, 10 apresentaram muco vaginal durante e após a introdução da pinça de Yomann pelo canal cervical. Esta reação foi observada após a realização da primeira biópsia no D0, dia da ovulação. Um dos animais apresentou uma reação inflamatória mais severa (parametrite), sendo descartado do experimento.

O muco sanguinolento foi observado, normalmente, após a retirada da pinça pelo canal cervical. A presença de catarro vaginal mucopurulento foi observada em quatro animais, sem prejuízo de sua ciclicidade; já a ocorrência de muco vaginal purulento foi observada em apenas um animal, o qual apresentou os cornos uterinos aumentados, coleção líquida com característica ultrassonográfica sugestiva de piometra e ausência de ovulação.

Discussão

A técnica de biópsia endometrial pode reforçar a investigação sobre a integridade uterina pela alta qualidade das amostras histológicas obtidas, em que foi possível detectar alterações fisiológicas ou patológicas no útero. Ao se repetir a amostragem deste estudo, obteve-se um rendimento consistente de 8 e 5 mm de tecido endometrial, incluindo a camada estromal. Estes mesmos dados foram obtidos por Chapwanya et al. (2010).

Os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com outros trabalhos que sugerem que, se a biópsia for realizada com o devido cuidado, fornecerá dados adequados sobre o estado do endométrio (Breeveld-Dwarkasing et al., 2003; Bauersachs et al., 2008; Herath et al., 2009; Chapwanya et al., 2010).

Entretanto, outros autores sugerem que a biópsia endometrial causa alterações severas ao endométrio uterino e no comportamento estral dos animais. Esses autores apontam que a investigação das amostras cervicais é preferível à realização da biópsia para o diagnóstico de infecções uterinas (Zaaver e van der Horst, 1986).

Não foi observada diferença na duração do ciclo estral, quando se compara o intervalo interovulatório relatado por outros autores, em animais da raça Nelore. Figueredo et al. (1997) observaram um intervalo interovulatório de $20,65 \pm 0,46$ e $22,00 \pm 0,44$ para animais da raça Nelore com duas e três ondas de crescimento folicular. Esses dados indicam que a realização de biópsias endometriais não levou à alteração do ciclo. Desta forma, a estratégia de colheita de fragmentos endometriais do corno contralateral ao corpo lúteo foi eficiente em não alterar a duração do ciclo estral.

Para acompanhar o ciclo estral, optou-se pela sincronização do estro; assim, foi escolhido o protocolo descrito por Barros et al. (2000), que, apesar de sincronizar a emergência da onda e o momento da luteólise, não possui um indutor de ovulação, não interferindo diretamente sobre o diâmetro do folículo ovulatório. O momento médio das ovulações foi $6,00 \pm 2,61$ dias (variando entre três e 13 dias) após a administração da prostaglandina. Este momento foi tardio, quando comparado com o obtido por Barros et al. (2000), os quais mostraram que as ovulações ocorreram dentro de um intervalo de 48 horas, que se iniciava em 72 horas após a aplicação de prostaglandina. Contudo, neste presente estudo foi retirado um animal que ovulou no sétimo dia.

A técnica de biópsia utilizada neste presente estudo forneceu bons resultados para a avaliação do endométrio uterino, pois das 72 lâminas confeccionadas, 86,11% ($n = 62$) continham material para o estudo. Esses dados foram superiores aos obtidos por Barbosa (2000), em que 82% das amostras apresentaram condições adequadas para análise histológica, e também por Bonnett et al. (1991), em que 70% das biópsias continham material de boa ou muito boa qualidade.

O infiltrado mononuclear foi predominante nas lâminas analisadas, com intensidade variada ao longo do ciclo estral, não caracterizando uma consequência direta das biópsias seriadas. Autores verificaram também a



prevalência de células inflamatórias mononucleares em endométrios bovinos, nas amostras colhidas 26 e 40 dias pós-parto (Bonnett et al, 1991). Da mesma forma, De Bois (1961), ao realizar colheitas de biópsias uterinas nos dias 10 e 20 pós-parto, observou que a intensidade de infiltrado mononuclear foi predominante nas duas colheitas e que a presença de células inflamatórias segmentadas foi evidente apenas na primeira colheita.

Com relação ao infiltrado polimorfonuclear, este oscilou durante o ciclo estral, porém parece ser uma reação inflamatória local. Na primeira biópsia realizada, dia zero (D0), não foram observadas células inflamatórias polimorfonucleares (neutrófilos), porém, nas demais colheitas, esta intensidade variou. Entretanto, na última colheita, não foram mais observados neutrófilos. Chapwanya et al. (2010) verificaram que as colheitas repetidas de biópsias uterinas não influenciaram o desencadeamento de células inflamatórias em animais 15, 30 ou 60 dias pós-parto. Esses autores observaram que 15 dias pós-parto as fêmeas apresentaram alta incidência de congestão glandular e proliferação de leucócitos de forma difusa no endométrio uterino. Já com 30 dias após o parto, observou-se uma intensidade moderada de leucócitos nas amostras endometriais. E, dessa forma, com 60 dias pós-parto, o epitélio uterino estava histologicamente íntegro, com ausência de infiltrado inflamatório, assim como de congestão vascular.

As alterações inflamatórias não seguiram um padrão preestabelecido com relação à sequência inflamatória como descrito por Kasimanickam et al. (2004), em que inicialmente ocorre infiltração polimorfonuclear, principalmente neutrófilos, como primeira linha de defesa, e, em seguida, a presença de infiltrado mononuclear, caracterizado principalmente por linfócitos. Isto pode ser devido a alterações fisiológicas e não causadas pelo método de diagnóstico realizado.

O muco vaginal sanguinolento observado imediatamente após a realização da biópsia, provavelmente, está associado à realização da técnica. Resultado similar foi relatado por Breeveld-Dwarkasing et al. (2003) quando realizaram biópsias cervicais em vacas gestantes. Porém, a presença deste sinal clínico não é suficiente para o diagnóstico de endometrite segundo LeBlanc et al. (2002) e Kasimanickam et al. (2003). Também foi observado catarro vaginal mucopurulento e purulento, sendo característico de infecção uterina (Murray et al., 1990; Huszenicza et al., 1991; Dohmen et al., 1995; Sheldon e Noakes, 1998; Williams et al., 2005; Sheldon et al., 2009). No presente estudo, foram realizadas biópsias uterinas repetidas em um mesmo ciclo, o que pode ter favorecido o aparecimento do quadro inflamatório, demonstrando a necessidade de maiores cuidados com a higienização prévia à colheita.

Conclusão

A técnica de biópsia endometrial se mostrou eficiente para a obtenção de amostras para a avaliação da higidez do útero, podendo ser empregada no diagnóstico de afecções desse órgão em fêmeas que falham em conceber. Adicionalmente, pode-se obter material suficiente para a avaliação histológica e imuno-histoquímica (Martin et al., 2008).

Com relação ao tipo de reação inflamatória, observou-se que o infiltrado mononuclear estava presente em grande parte das amostras histológicas endometriais e que o infiltrado polimorfonuclear foi verificado com menor intensidade.

Referências

- Barbosa ML.** Aspectos bacteriológicos, clínicos e fisio-histológicos de fêmeas bovinas em anestro. 2000. 23f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2000.
- Barros CM, Moreira MBP, Figueiredo RA, Teixeira AB, Trinca LA.** Synchronization of ovulation in beef cows (*Bos indicus*) using GnRH, PGF2 α and estradiol benzoate. *Theriogenology*, v.53, p.1121-1134, 2000.
- Bauersachs S, Mitko K, Ulbrich SE, Blum H, Wolf E.** Transcriptome studies of bovine endometrium reveal molecular profiles characteristic for specific stages of estrous cycle and early pregnancy. *Exp Clin Endocrinol*, v.116, p.371-384, 2008.
- Bonnett BN, Miller WG, Etherington WG, Martin SW, Johnson WH.** Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows I. Technique, histological criteria and results. *Can J Vet Res*, v.55, p.155-161, 1991.
- Breeveld-Dwarkasing VNA, Koppelaar JJM, Bank RA, van der Weijden GC, Taverne MAM, van Dissel-Emiliani FMF.** Changes in water content, collagen degradation, collagen content, and concentration in repeated biopsies of the cervix of pregnant cows. *Biol Reprod*, v.69, p.1608-1614, 2003.
- Chapwanya A, Meade KG, Narciandi F, Stanley P, Mee JF, Doherty ML, Callanan JJ, O'Farrelly C.** Endometrial biopsy: a valuable clinical and research tool in bovine reproduction. *Theriogenology*, v.73, p.988-994, 2010.
- De Bois CHW.** Endometritis and fertility of the cow. 1961. Thesis - University of Utrecht, Utrecht, Netherlands, 1961.
- Dohmen MJW, Lohuis JACM, Huszwnicza G, Nagy P, Gacs C.** The relationship between bacteriological and clinical findings in cows with subacute/chronic endometritis. *Theriogenology*, v.43, p.1379-1388, 1995.



- Figuiiredo RA, Barros CM, Pinheiro OL, Soler JMP.** Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology*, v.47, p.1489-1505, 1997.
- Gilbert RO, Shin ST, Guard CL, Erb HN, Frajblat M.** Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology*, v.64, p.1879-1888, 2005.
- Herath S, Lilly ST, Santos NR, Gilbert RO, Goetze L, Bryant CE.** Expression of genes associated with immunity in the endometrium of cattle with disparate postpartum uterine disease and fertility. *Reprod Biol Endocrinol*, v.7, p.55, 2009.
- Huszenicza G, Fodor M, Gacs M, Kulcsar M, Dohmen MJW, Vamos M.** Uterine bacteriology, resumption of cyclic ovarian activity and fertility in postpartum cows kept in large-scale dairy herds. *Reprod Domest Anim*, v.34, p.237-245, 1991.
- Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton JS, Johnson WH.** Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology*, v.62, p.9-23, 2004.
- LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, Bateman KG, Keefe GP, Walton JS.** Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *J Dairy Sci*, v.85, p.2223-2236, 2002.
- Lewis GS.** Steroidal regulation of uterine resistance to bacterial infection in livestock. *Reprod Biol Endocrinol*, v.1, p.1-8, 2003.
- Martin I, Torres Neto R, Oba E, Buratini Jr J, Binelli M, Laufer-Amorim R, Ferreira JCP.** Immunohistological detection of receptors for oestrogen and progesterone in endometrial glands and stroma during the oestrous cycle in Nelore (*Bos taurus indicus*) cows. *Reprod Domest Anim*, v.43, p.415-421, 2008.
- Martins CF, Vasques L, Neis F, Tardin M, Visioly V, Fernandes CE.** Biópsia endometrial em vacas *Bos taurus indicus* em sistema extensivo com problemas de fertilidade. *Ensaio Cienc.*, v.6, n.2, p.13-33, 2002.
- Murray RD, Allison JD, Gard RP.** Bovine endometritis: comparative efficacy of alfaprostol and intrauterine therapies, and other factors influencing clinical success. *Vet Rec*, v.127, p.86-90, 1990.
- Sheldon IM, Cronin J, Goetze L, Donofrio G, Schuberth HJ.** Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biol Reprod*, v.81, p.1025-1032, 2009.
- Sheldon IM, Noakes DE.** Comparison of three treatments for bovine endometritis. *Vet Rec*, v.142, p.575-579, 1998.
- Wildman EE, Jones GM, Wagner PE.** A dairy cow body condition score system and its relationship to select production characteristics. *J Dairy Sci*, v.65, p.495-501, 1982.
- Williams EJ, Fischer DP, Pfeiffer DU, England GCW, Noakes DE, Dobson H, Sheldon IM.** Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology*, v.65, p.102-107, 2005.
- Zaayer D, van der Horst CJ.** Non-fertility in cows: treatment with PGF and investigation of uterine biopsies. *Cytobios*, v.45, p.55-70, 1986.
-