

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

**“EFECTO DEL TRATAMIENTO CON OXITOCINA Y/O PROSTAGLANDINA E2
SOBRE LA PENETRABILIDAD CERVICAL EN OVEJAS CORRIEDALE AL
MOMENTO DE LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL A TIEMPO FIJO”**

por

BARRETO ALBERTINI, Andrea
RODRÍGUEZ BERMÚDEZ, Jéssica

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias
Orientación: Producción Animal

MODALIDAD: Ensayo Experimental

MONTEVIDEO
URUGUAY
2016

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de Grado aprobada por:

Presidente de Mesa:

Dr. Juan Pablo Damián

Segundo Miembro (tutor):

Dr. Marcelo Rodríguez

Tercer Miembro:

Dr. Rafael Aragunde

Cuarto Miembro (co-tutor):

Dra. Daniela Casuriaga

Fecha:

20 de Diciembre de 2016

Autores:

Br. Andrea Barreto Albertini

Br. Jéssica Rodríguez Bermúdez

AGRADECIMIENTOS

Queremos brindar nuestros sinceros agradecimientos a nuestro tutor y co-tutora, Dr. Marcelo Rodríguez y Dra. Daniela Casuriaga por la paciencia, dedicación, confianza y el respaldo brindado hacia nosotros. Ha sido un privilegio poder contar con su guía y ayuda.

A todos los integrantes del proyecto por la ayuda y la dedicación día a día durante todo el período experimental y quienes permitieron que este ensayo sea llevado a cabo. También a la Facultad de Veterinaria por habernos permitido formar parte de ella y brindado las herramientas necesarias para nuestra formación como futuros profesionales, a las personas de la biblioteca por su atención y amabilidad, al Departamento de Teriogenología, y al Área de Bioquímica por la ayuda brindada.

A nuestras familias y amigos que nos ayudaron y brindaron su apoyo durante toda la carrera universitaria, lo que ha sido de fundamental importancia para desarrollarnos como seres humanos y futuros profesionales.

Queremos también agradecerle a todos los compañeros que formaron parte de este trabajo experimental. Y también a todos los amigos que nos regaló la Facultad.

A todos muchas gracias!

| TABLA DE CONTENIDO | Página |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| PÁGINA DE APROBACIÓN | 2 |
| AGRADECIMIENTOS | 3 |
| LISTA DE CUADROS Y FIGURAS | 5 |
| RESUMEN..... | 6 |
| SUMMARY | 7 |
| INTRODUCCIÓN..... | 9 |
| REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | 9 |
| HIPÓTESIS | 10 |
| OBJETIVO GENERAL..... | 10 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 11 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 11 |
| RESULTADOS | 12 |
| Penetrabilidad al momento de la IATF (54h post eCG) in vivo y postmortem | 12 |
| Variación de la penetrabilidad desde las 0 a las 68h post eCG | 14 |
| Variación de penetrabilidad en los intervalos pre (0 a 42h post ecG), intra (42 a 54h post ecG) y post (54 a 68h post ecG) tratamiento de inducción de la dilatación cervical | 15 |
| DISCUSIÓN..... | 15 |
| CONCLUSIÓN..... | 17 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 18 |

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

| | Página |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Tabla 1. Largo del cérvix (cm) y penetrabilidad en función del largo del cérvix (%) | 14 |
| Tabla 2. Penetrabilidad cervical absoluta (cm) | 14 |
| Gráfico 1. Correlación entre la penetrabilidad (cm) medida in vivo y postmortem | 13 |
| Gráfico 2. Penetrabilidad cervical absoluta (cm)..... | 15 |
| Gráfico 3. Diferencia de penetrabilidad cervical (cm) en el intervalo intratratamiento | 16 |

RESUMEN

El experimento propone la utilización de análogos sintéticos de Oxitocina (Carbetocina, Cb) y PGE2 (Dinoprostone, Dp) para producir la dilatación del cérvix de ovejas Corriedale, con el fin de aportar al desarrollo de estrategias para facilitar la inseminación artificial transcervical y aumentar la eficiencia reproductiva.

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de los tratamientos con Cb o Dp y de la administración conjunta de ambas drogas sobre la penetrabilidad cervical al momento de la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF, 54h post eCG) in vivo y postmortem. Se utilizaron 40 ovejas multíparas de raza Corriedale las cuales fueron destinadas a cuatro grupos al azar, todas sincronizadas con esponja impregnada con 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP, Syntex, Buenos Aires, Argentina) por 13 días y la administración de 300 UI de eCG i.m. (Novormon 5000®, Syntex, Buenos Aires, Argentina) al momento de retirar la esponja. Se le asignó uno de éstos tratamientos a cada grupo: grupo Cb, 40 µg (2 mL) i.m. de Cb (Decomotón, Laboratorios Callier, Uruguay); grupo Dp, 10 mg de Dp en un dispositivo intravaginal de liberación lenta (Propess®, Ferring Pharmaceuticals Ltd., West Drayton, Reino Unido); grupo Cb+Dp, con idénticos tratamientos que los anteriores en forma conjunta y un grupo Control placebo de ambos tratamientos. En todos los animales se midió la penetrabilidad cervical a las 0h, 42h, 54h. A las 54 h post eCG (momento de la IATF), la mitad de los animales fueron sacrificados para la determinación de la penetrabilidad postmortem y largo del cérvix y, a los que no fueron sacrificados, la penetrabilidad fue también determinada a las 68h post eCG.

Los resultados fueron analizados mediante el procedimiento mixto de ANOVA para muestras repetidas de SAS (Statistical Analysis Systems SAS Institute, Cary, NC, EEUU, 2000), incorporando al análisis el efecto fijo del grupo de tratamiento, las h post eCG y su interacción. Para estudiar la relación entre penetrabilidad in vivo y postmortem se utilizó el test de correlación de Pearson.

A las 54 h post eCG, la penetrabilidad (cm, media±sem) tanto in vivo como postmortem no fue diferente entre los grupos experimentales, 1.79±0.14, n=40 y 2.31±0.24, n=20, P=0.4755, respectivamente, encontrándose una correlación positiva entre ambas (r=0,7012; n=20; P<0,0006). La penetrabilidad postmortem expresada en relación al largo del cérvix (% , media±sem) significó un 34.6±4.1, n=20, sin variaciones entre grupos experimentales. Hubo un efecto de la hora post eCG sobre la penetrabilidad in vivo (P<0.05), que aumentó desde las 0 h a las 42 h y de las 42 h a las 54 h post eCG, para bajar a las 68 h a valores similares a los de las 42 h post eCG. También hubo un efecto de la interacción entre grupos experimentales y la h post eCG sobre la penetrabilidad in vivo (P<0.04), que aumentó de las 0 h a las 42 h y de las 42 h a las 54 h y 68 h post eCG en los grupos tratados (Cb, Dp y Cb+Dp) y aumentó de las 0 h a las 42 h pero luego bajó hasta recuperar los valores iniciales a las 68 h post eCG en el grupo control (C). La variación de la penetrabilidad (penetrabilidad final menos penetrabilidad inicial, cm) fue afectada por el grupo experimental solamente en el intervalo intra-tratamiento (42 a 54h post eCG) (P<0.049), siendo positiva en los grupos tratados y negativa en el grupo control.

Se puede concluir que los tratamientos con Cb im y Dp intravaginal en ovejas Corriedale ciclando sincronizadas con MAP y eCG no lograron un aumento

significativo de la penetrabilidad cervical al momento de la IATF, pero lograron evitar una caída de la penetrabilidad en el intervalo intra tratamiento, que se tradujo en un atraso del retorno a los valores iniciales de penetrabilidad en las horas siguientes a la IATF. El tratamiento combinado de Cb y Dp no potenció la respuesta de cada uno de ellos por separado

SUMMARY

The experiment proposed to use synthetic analogues of Oxytocin (Carbetocin, Cb) and PGE2 (Dinoprostone, Dp) to produce cervical dilatation in Corriedale ewes, in order to contribute to the development of strategies to facilitate transcervical artificial insemination and increase reproductive efficiency.

The objective of this study was to determine the effect of Cb or Dp treatments and the co-administration of both drugs on cervical penetrability at the time of artificial insemination at fixed time (IATF, 54h post eCG) in vivo and postmortem. A total of 40 multiparous Corriedale ewes were used, which were assigned to four random groups, all of them synchronized with an impregnated sponge with 60 mg of medroxyprogesterone acetate (MAP, Syntex, Buenos Aires, Argentina) for 13 days and 300 IU of eCG im (Novormon 5000®, Syntex, Buenos Aires, Argentina) when the sponge was removed. One of the followed treatments was assigned to each group: Cb group, 40 µg (2 mL) i.m. of Cb (Decomotón, Laboratorios Callier, Uruguay); Dp group, 10 mg Dp in a slow release intravaginal device (Propess®, Ferring Pharmaceuticals Ltd., West Drayton, UK); Cb + Dp group, with identical treatments previously described and a Control group. Cervical penetrability was measured at 0, 42 and 54h in all animals. At 54h post eCG (time of IATF), half of the animals were sacrificed for the determination of postmortem cervical penetrability and length. In the rest of the ewes, the cervical penetrability was also determined at 68h post eCG .

The results were analyzed using the mixed ANOVA procedure for repeated samples of SAS (Statistical Analysis Systems SAS Institute, Cary, NC, EEUU, 2000), incorporating the fixed effects of the treatment group, h post eCG and their interactions into the analysis. The Pearson correlation test was used to study the relationship between in vivo and postmortem cervical penetrability.

At 54h post eCG, the cervical penetrability (cm, media ± sem) in vivo and postmortem was not different between groups ($P > 0.05$), 1.79 ± 0.14 , $n = 40$ and 2.31 ± 0.24 , $n = 20$, $P = 0.4755$, respectively, with a positive correlation between them ($r = 0.7012$; $n = 20$; $P < 0.0006$). The postmortem penetrability expressed in relation to the length of the cervix (% , media ± sem) was 34.6 ± 4.1 , $n = 20$, without variations between groups. There was an effect of the h post eCG on in vivo cervical penetrability ($P < 0.05$), which increased from 0h at 42h and from 42h at 54h post eCG, and decreased at 68h to similar values those at 42 h post eCG. There was an effect of the interaction between groups and h post eCG on in vivo cervical penetrability ($P < 0.04$). Cervical penetrability increased from 0h at 42h and from 42h at 54h and 68h post eCG in the treated groups (Cb, Dp and Cb + Dp) and increased from 0h at 42h but then decreased until the initial values at 68h post eCG in the control group (C). The variation of cervical penetrability (difference between final and initial penetrability, cm) was affected by the experimental group only in the intra-

treatment interval (42 to 54h post eCG) ($P < 0.049$), being positive in the treated groups and negative in the Control group.

It can be concluded that the treatments with Cb i.m. and Dp intravaginal in Corriedale ewes synchronized with MAP and eCG did not achieve a significant increase in cervical penetrability at the time of IATF, but avoided the decrease of the cervical penetrability during the intra-treatment interval, resulting in a delay of the return to the initial values after the IATF time. The combined treatment of Cb and Dp did not potentiate the response of each of them separately.

INTRODUCCIÓN

La producción ovina representa el 9% del producto bruto interno agropecuario del país (M.G.A.P. 2015). El Uruguay cuenta actualmente con poco más de 6.6 millones de ovejas (DI.CO.SE. 2015), luego de una caída del stock ovino en aproximadamente 16 millones de animales desde los años 90. En este contexto, la utilización de inseminación artificial (IA) es fundamental para el mantenimiento de la eficiencia económica del rubro (I.N.I.A. 2011). La aplicación de la IA en ovinos es limitada, en parte debido a la dificultad para la canulación transcervical (Salamon y Maxwell 2000). El cérvix ovino es pequeño, estrecho y posee anillos que restringen la luz del canal cervical (Moré 1984; Halbert y col., 1990a, Campbell y col., 1996; Kershaw y col., 2005). Como consecuencia, en la gran mayoría de las ovejas solo es posible la IA en el orificio cervical caudal, lo que determina índices de concepción que rara vez superan el 50% utilizando semen congelado (Salamon y Maxwell 2000, King y col., 2004, Fierro y col., 2013). Estos resultados mejoran con la profundidad de la canulación y son máximos utilizando la IA uterina transcervical (Windsor y col., 1994, Salamon y Maxwell 2000).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Durante el estro ocurre cierto grado de dilatación natural del cérvix de la oveja, el que sería promovido por la alta relación estrógenos/progesterona circulante (Halbert y col., 1990a). En el tejido cervical, la señal hormonal se amplificaría en forma autócrina y/o parácrina mediante el sistema oxitocina/prostaglandina E2. Este entorno hormonal produciría cambios cuali y cuantitativos en la composición de la matriz extracelular cervical, desagregando y degradando activamente el colágeno, lo que produciría la dilatación del cérvix (revisado en Rodríguez-Piñón 2015).

Las estrategias desarrolladas para dilatar el cérvix ovino y acceder al útero transcervicalmente incluyen: la apertura física utilizando instrumental especialmente diseñado para ovinos (Halbert y col., 1990b, Wulster-Radcliffe y Lewis 2002) y la inducción hormonal de la dilatación cervical (revisado en Rodríguez-Piñón 2003 y 2006, Robinson y col., 2011, Candappa y Bartlewsky 2012). La primera ha mostrado producir efectos negativos sobre la fertilidad (Campbell y col., 1996, Wulster-Radcliffe y col., 2004). La segunda está basada en el conocimiento de la fisiología de la dilatación del cérvix y se presenta como la más eficiente y menos costosa. Se han utilizado distintas hormonas para dilatar el cérvix y facilitar su canulación, entre ellas la oxitocina (Ox) (Sayre y Lewis 1996 y 1997, Stellflug y col., 2001, King y col., 2004) y las prostaglandinas (Owiny y Fitzpatrick 1990, Leethongdee y col. 2010), administradas solas o combinadas (Leethongdee y col., 2007).

Si bien la administración de Ox ha aumentado la penetrabilidad cervical se han visto algunos efectos negativos sobre la fertilidad (Stellflug y col., 2001, King y col., 2004, Candappa y Bartlewski 2012). Estos efectos podrían ser adjudicados a que se utilizaron dosis supra-fisiológicas de Ox (10 a 400 UI), considerando que el aumento de Ox en respuesta a la estimulación cérvico-vaginal de la canulación cervical fue reproducido mediante la administración i/v de solo 100 mUI de Ox (Houdeau y col., 2002). En este sentido y considerando la corta vida media de la hormona (minutos), (King y col., 2004) sugirieron que sería más efectivo administrar una serie de dosis

pequeñas que una única dosis, imitando los pulsos de Ox que ocurrirían durante el estro natural (Wathes y col., 1986, Gilbert y col., 1991). Sin embargo, este tipo de administración quedaría restringida a la aplicación experimental.

Actualmente existe en el mercado un análogo sintético de la Ox; la Carbetocina (Cb), cuya actividad de unión al receptor de Ox es similar al de la Ox natural y su vida media se prolonga por 12h (Atke y Vilhardt 1987). Esto podría asegurar un efecto oxitócico lo suficientemente largo para desencadenar los procesos de remodelación cervical sin necesidad de usar administraciones repetidas o altas dosis. Hemos encontrado un solo trabajo en bovinos donde la Cb fue utilizada para inducir la dilatación cervical al parto con resultados positivos sobre esta (Zobel y Taponen 2014) pero no hemos encontrado reportes de la utilización de Cb en ovinos.

A pesar de que las evidencias indican que la prostaglandina vinculada a los procesos de remodelación del colágeno cervical es la prostaglandina E2 (PGE2) (Ellwood y col., 1980, Ledger y col., 1983, Shemesh y col., 1997, Fuchs y col., 2002, Wu y col., 2005), la prostaglandina más utilizada experimentalmente en ovinos como inductor de la dilatación cervical es un análogo sintético de la prostaglandina E1 (Misoprostol) con el cual se logró aumentar la penetrabilidad cervical en ovejas ciclando con respecto a los controles (Leethongdee y col., 2007).

Más recientemente, se ha reportado que el Dinoprostone (Dp), una preparación intravaginal de PGE2 de liberación lenta, ha aumentado la penetrabilidad cervical en ovejas en anestro y ciclando de razas carniceras (Candappa y col., 2014 y 2015). Tanto los trabajos que utilizaron el Misoprostol como los que utilizaron Dp, fueron realizados en ovejas de razas grandes (Rideau Arcott x Polled Dorset y Welsh Mountain) cuyo peso promedio es 70-90 kg en las hembras adultas (Candappa y col., 2014 y 2015). No hemos encontrado reportes de la utilización de Dp asociado o no con Cb para facilitar la penetrabilidad cervical durante la estación reproductiva, en ovejas Corriedale que son de doble propósito y cuyos pesos promedian 40 kg.

HIPÓTESIS

Esta propuesta consiste en obtener evidencias experimentales sobre la utilización de análogos sintéticos de Ox (Cb) y PGE2 (Dp) para producir la dilatación del cérvix de ovejas Corriedale, con el fin de aportar al desarrollo de estrategias para facilitar la IA transcervical y aumentar la eficiencia reproductiva.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de los tratamientos con Carbetocina o Dinoprostone y de la administración conjunta de ambas drogas sobre la penetrabilidad cervical en ovejas Corriedale con ovulación sincronizada al momento en que se realizaría la inseminación artificial a tiempo fijo (54h post ecG) y desde la hora 0 hasta las 68 horas post ecG.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el efecto de la administración de Cb o Dp y de la administración conjunta de ambas drogas sobre la penetrabilidad cervical in vivo y postmortem al momento en que se realizaría la IATF (54h post eCG) y relacionar las variables entre sí.
2. Relacionar el largo del cérvix con la penetrabilidad postmortem a las 54h post eCG.
3. Determinar el efecto de la administración de Cb o Dp y de la administración conjunta de ambas drogas sobre la penetrabilidad cervical en ovejas sincronizadas desde la hora 0 hasta las 68 horas post eCG.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cuarenta ovejas Corriedale multíparas provenientes de la misma majada, con un peso homogéneo (media±sem, 46±0,9 Kg) y un estado corporal de 2.5 a 3.5 en la escala de 0-5 de Russel y col., (1969), alimentadas con fardo y pasturas mejoradas. El ensayo se realizó en el campo experimental nº1 Estación Migués de la Facultad de Veterinaria, Canelones, Uruguay. Fueron tratadas con el protocolo MAP-eCG, diseñado para realizar una IATF a las 54 h post-eCG (Olivera-Muzante y col., 2011). El mismo consistió en la administración intravaginal de una esponja impregnada con 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP, Syntex, Buenos Aires, Argentina) por 13 días y la administración de 300 UI de eCG i.m. (Novormon 5000®, Syntex, Buenos Aires, Argentina) al momento de retirar la esponja. Doce horas antes de la IATF (42 h post-eCG), las ovejas fueron asignadas aleatoriamente a los cuatro Grupos de tratamientos para inducir la dilatación cervical de acuerdo a un arreglo factorial 2X2 (Cb, Dp, Cb+Dp y C, n=10 en cada uno) y tratadas correspondientemente. El Grupo Cb fue tratado con 40 µg (2 mL) i.m. de Cb (Decomotón, Laboratorios Callier, Uruguay) y se le puso un dispositivo intravaginal sin principio activo (Propess®) como placebo. El Grupo Dp fue tratado con 10 mg de Dp dispositivo intravaginal de liberación lenta (Propess®, Ferring Pharmaceuticals Ltd., West Drayton, Reino Unido) y se le inyectó solución salina (2 mL) i.m. El grupo Cb+Dp fue tratado con ambas hormonas y al Grupo C se le administró solución salina (2 mL) i.m. y un dispositivo intravaginal como placebo. Luego de la limpieza y desinfección de la zona perineal, se realizó la aplicación de los dispositivos intravaginales lo más próximo al anillo cervical caudal posible, para lo que se utilizó un vaginoscopio, colocando el animal con el tren posterior elevado, utilizando para esto un caballete de madera acolchonado en la parte donde se apoyaba la oveja.

En todos los animales se midió la penetrabilidad cervical a las 0h (al retiro de la esponja e inmediatamente antes de la administración de eCG), 42h (inmediatamente antes de los tratamientos de inducción a la dilatación cervical), 54h (momento de la IATF). A las 54 h post eCG (momento de la IATF), la mitad de los animales (5 por grupo) fueron sacrificados para la determinación de la penetrabilidad postmortem y

largo del cérvix y, a los que no fueron sacrificados, la penetrabilidad fue también determinada a las 68h post eCG.

La penetrabilidad cervical se determinó mediante la introducción transcervical de una sonda de transferencia de embriones de uso bovino, de 3.2 mm de diámetro externo de punta roma, cubierta con una camisa. En el extremo posterior, la sonda fue graduada con una escala de 0 a 7 cm con 1 mm de apreciación, de manera que el punto 0 estuviera ajustado al alinear los extremos anteriores de la sonda y la camisa. Luego de la limpieza y desinfección de la zona perineal, se introdujo la sonda con ayuda de un vaginoscopio lubricado con carboximetilcelulosa hasta que los bordes del vaginoscopio logren la protrusión del orificio cervical externo al coaptar con el fórnix cérvico-vaginal. Mediante movimientos suaves se introdujo la sonda en el orificio cervical externo, y se registró el valor máximo de penetrabilidad (cm) luego de tres intentos de canulación. Los datos de penetrabilidad se van a expresar como penetrabilidad absoluta (cm), como variación de la penetrabilidad (final- inicial) y referida al largo del cérvix (%).

Análisis Estadístico:

Los datos de largo y penetrabilidad cervical se analizaron mediante el procedimiento mixto de ANOVA para muestras repetidas (Statistical Analysis Systems SAS Institute, Cary, NC, EEUU, 2000), incorporando al análisis el efecto fijo del grupo de tratamiento (Cb, Dp, Cb+Dp y C) y las h post eCG (0, 42, 54 y 68). Para estudiar la relación entre penetrabilidad in vivo y postmortem se utilizó el test de correlación de Pearson. Los datos serán presentados como medias s.e.m., con diferencias consideradas significativas para $P < 0,05$ y tendencias para $0,05 < P < 0,1$.

RESULTADOS

Penetrabilidad al momento de la IATF (54h post eCG) in vivo y postmortem

A las 54 h post eCG, la penetrabilidad (cm) tanto in vivo como postmortem no fue diferente entre los grupos experimentales, siendo (media \pm sem) 1.79 \pm 0.14, n=40, $P=0.1498$ y 2.31 \pm 0.24, n=20, $P=0.4755$, respectivamente. La penetrabilidad (cm) a las 54h post eCG medida in vivo se correlacionó positivamente con la penetrabilidad medida post mortem ($r=0,7012$; n=20; $P < 0,0006$) (Gráfico 1).

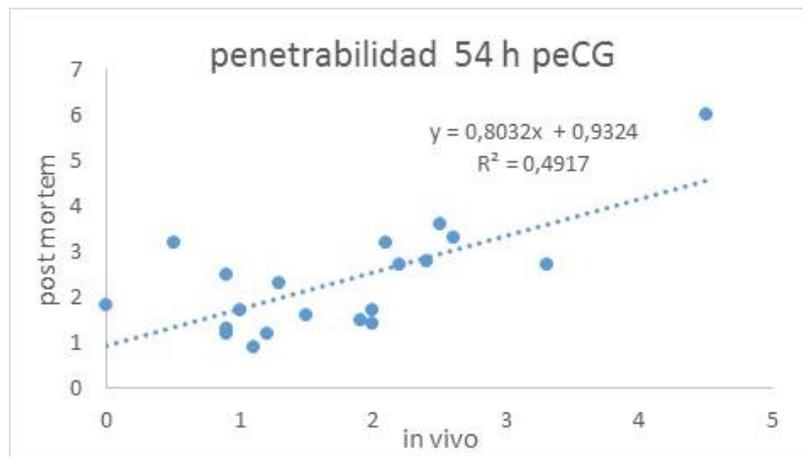


Gráfico 1. Correlación entre la penetrabilidad (cm) medida in vivo y postmortem a las 54 h post eCG (400 UI), previo tratamiento con medroxiprogesterona (60 mg, intravaginal) por 13 días.

El largo del cérvix (media±sem) a las 54h post eCG fue de 6.7±0.2 cm y tendió a ser diferente entre grupos experimentales (P=0.0873) y se correlacionó positivamente con el peso cervical (g) (r=0,7455; n=20; P<0,0002). El grupo Cb tendió a tener mayor largo del cérvix que los grupos Cb+Dp y C (Tabla 1). La penetrabilidad postmortem expresada en relación al largo del cérvix (%) no varió entre los grupos experimentales y fue de (media±sem) 34.6±4.1, n=20, P=0.7308 (Tabla 1).

| Grupo (n) | Largo del cérvix (cm, media±sem) | Penetrabilidad como % del largo del cérvix (media±sem) |
|-----------|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| Cb (5) | 7.5±0.5 a | 35.3±5.3 a |
| Dp (5) | 7.0±0.4 ab | 38.7±5.0 a |
| Cb+Dp (5) | 6.3±0.3 b | 38.1±1.6 a |
| C (5) | 6.1±0.3 b | 26.1±1.0 a |

Tabla 1. Largo del cérvix (cm) y penetrabilidad en función del largo del cérvix (%) (media±sem) en ovejas a las 54 post eCG (400 UI) n=20, previo priming con medroxiprogesterona (60 mg, intravaginal) por 13 días. A las 42 h post eCG se trataron para inducir la dilatación cervical con Carbetocina (Cb, 1µg/Kg, im y dispositivo intravaginal placebo), Dinoprostone (Dp, 10 mg dispositivo intravaginal e inyección im placebo), ambos tratamientos combinados (Cb+Dp) y dispositivo intravaginal e inyección im placebos (C). Dentro de cada columna, letras distintas indican diferencias con una P=0.0873.

Variación de la penetrabilidad desde las 0 a las 68h post eCG.

Hubo un efecto de la h post eCG sobre la penetrabilidad (cm) *in vivo* ($P<0.05$). La penetrabilidad absoluta aumentó desde las 0 h a las 42 h y de las 42 h a las 54 h post eCG, para bajar a las 68 h a valores similares a los de las 42 h post eCG (Tabla 2).

| h post eCG | 0 (n=40) | 42 (n=40) | 54 (n=40) | 68 (n=20) |
|------------------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| Penetrabilidad absoluta (cm) | 0.64±0.06 a | 1.57±0.11 b | 1.83±0.14 c | 1.66±0.09 bc |

Tabla 2. Penetrabilidad cervical absoluta (cm, media±sem) en ovejas a las 0, 42, 54 y 68 h post eCG (400 UI), previo tratamiento con medroxiprogesterona (60 mg, intravaginal) por 13 días. Las letras indican diferencias significativas con una $P<0.0001$.

También hubo un efecto de la interacción entre grupos experimentales y la h post eCG sobre la penetrabilidad *in vivo* ($P<0.04$). En los grupos tratados (Cb, Dp y Cb+Dp), la penetrabilidad absoluta (cm) aumentó de las 0 h a las 42 h y de las 42 h a las 54 h post eCG, y se mantuvo hasta las 68 h post eCG. Sin embargo, en el grupo C (control), aumentó de las 0 h a las 42 h y luego bajó hasta recuperar los valores iniciales a las 68 h post eCG (Gráfico 2).

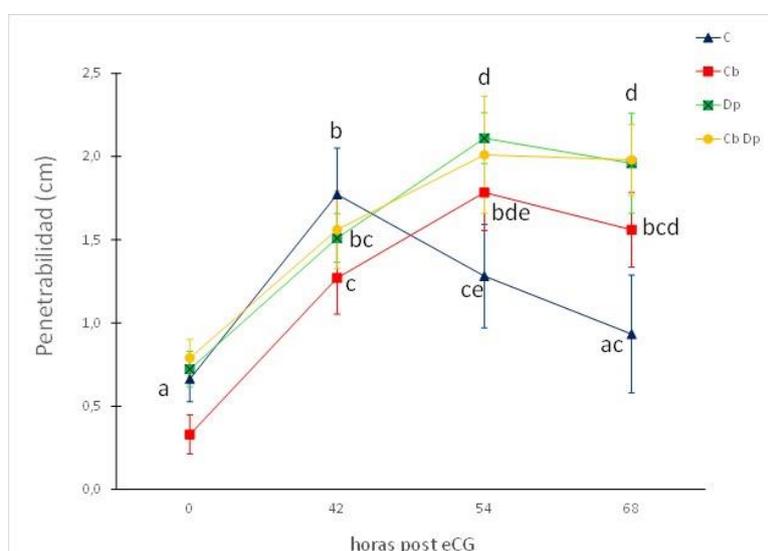


Gráfico 2. Penetrabilidad cervical absoluta (cm, media±sem) en ovejas a las 0, 42, 54 y 68 h post eCG (400 UI), previo tratamiento con medroxiprogesterona (60 mg intravaginal) por 13 días. A las 42 h post eCG se trataron para inducir la dilatación cervical con Carbetocina (Cb, 1µg/Kg, im y dispositivo intravaginal placebo), Dinoprostone (Dp, 10 mg dispositivo intravaginal e inyección im placebo), ambos tratamiento combinados (Cb y Dp) y dispositivo intravaginal placebo e inyección im placebo (C). A las 0, 42 y 54 h, n=10 en cada grupo y a las 68 h n=5 en cada grupo. Las diferencias se indican con letras ($P<0.05$).

Variación de penetrabilidad en los intervalos pre (0 a 42h post ecG), intra (42 a 54h post ecG) y post (54 a 68h post ecG) tratamiento de inducción de la dilatación cervical.

La variación de la penetrabilidad (penetrabilidad final menos penetrabilidad inicial, cm) fue afectada por el grupo experimental solamente en el intervalo intra-tratamiento (42 a 54h post eCG) ($P < 0.049$). La diferencia de penetrabilidad fue positiva en los grupos tratados (Cb, Dp y Cb+Dp) y negativa en el grupo control (C). (Gráfico 3).

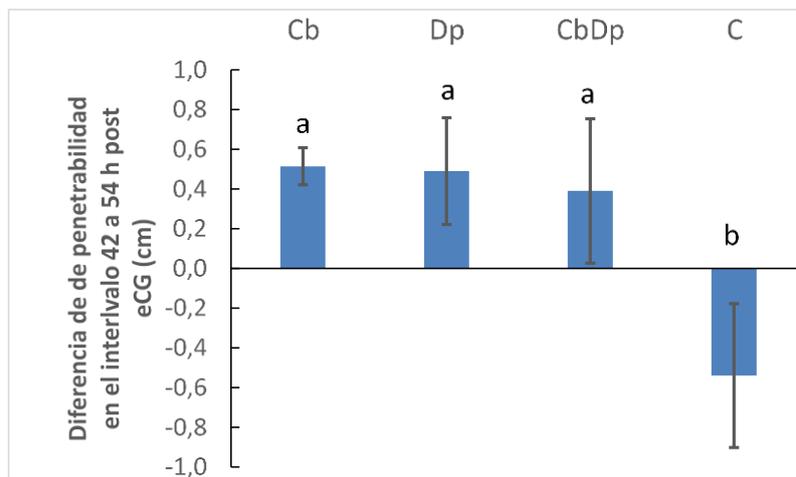


Gráfico 3. Diferencia de penetrabilidad cervical (cm, media±sem) en el intervalo 42 a 54 h post eCG en ovejas sincronizadas con medroxiprogesterona (60 mg intravaginal) por 13 días y eCG.

DISCUSIÓN

Luego de 12 h de tratamiento para inducir la dilatación cervical, los animales del grupo Cb tendieron a tener mayor largo del cérvix que los demás animales. No hemos encontrado otros reportes acerca del efecto de la administración de oxitocina o análogos sobre el largo del cérvix. Dado que el largo del cérvix se correlacionó positivamente con el peso cervical, el mayor largo cervical en las ovejas tratadas con Cb podría ser reflejo de un aumento global del volumen del órgano, el que podría ser producto de un aumento del riego sanguíneo, como fue demostrado en útero de mujer luego de la administración de Ox (Hauksson y col. 1988).

La correlación positiva encontrada entre las medidas de penetrabilidad in vivo y post mortem indica que las medidas in vivo reproducen con confiabilidad las medidas postmortem. La penetrabilidad postmortem al momento de la IA (a las 54 h post eCG) fue de un 35% del largo del cérvix, aproximadamente 1/3 del mismo. Según el trabajo de Salamon S, Maxwell W. (2000), cuando la penetrabilidad alcanzada es entre 25 y 40%, el porcentaje de fertilidad oscilaría entre 47% y 61%, que es lo habitual en éste tipo de protocolo de IATF e inseminación con semen congelado en nuestro país (Fierro y col. 2013)

Tanto in vivo como postmortem, la penetrabilidad al momento de la IATF (54 h post-eCG) no fue diferente entre los grupos experimentales. Resultados similares obtuvieron Gil y col. (2005), que no encontraron diferencias a las 6 h de usar Ox natural iv o cervical administradas al estro en ovejas Corriedale respecto a los controles. En este trabajo, se obtuvieron dispersiones en las medidas de penetrabilidad de casi un 100% en, probablemente debido a una baja sincronización de los celos naturales detectados con retarjos sumado a la variabilidad individual de la penetrabilidad cervical (Halbert G. y col. 1990b, Naqvi S y col. 1998). Este alto grado de dispersión en el trabajo de Gil y col (2005) contrasta con los obtenidos en nuestro trabajo, donde el coeficiente de variación de la penetrabilidad a las 54 h, expresada como porcentaje del cérvix, fue de 23% promedio en los grupos tratados y 4% en los controles, probablemente debido a la sincronización de la ovulación con el tratamiento MAP+eCG. Si bien no hubo una diferencia significativa en los valores de penetrabilidad a las 54 h entre los grupos, la mayor dispersión en los grupos tratados sugiere cierta variación individual de la respuesta a los tratamientos o que el número de animales utilizados en el experimento no fue suficiente. En forma similar, Falchi y col (2012), usando animales ciclando sincronizados con esponjas de fluorogestano y eCG, tampoco registraron diferencias de penetrabilidad cervical medida a las 54 h post eCG en ovejas tratadas con Misoprostol intravaginal a las 46 y 50 h post eCG y los controles no tratados, así como tampoco en ovejas tratadas con Ox intracervical a las 30 h post eCG y sus controles.

En los animales controles, la penetrabilidad cervical aumento hasta las 42 post-eCG y luego tuvo una caída brusca. El cérvix sufre grandes cambios estructurales con el fin de cumplir con una amplia gama de funciones (Word y col. 2007). La caída de la penetrabilidad a partir de las 42h post-eCG del grupo control podría ser parte del mecanismo de defensa natural del cérvix: luego del pasaje de los espermatozoides, el cérvix se cerraría para actuar como barrera protectora a infecciones (Gorodeski y col. 1996). Similarmente, Falchi et al. (2012) encontraron que el máximo de penetrabilidad se daba a las 54 h post eCG en ovejas ciclando Ile de France, Romanov y Vendéenne sincronizadas con esponjas de fluorogestágeno. En otro experimento, en ovejas Welsh Mountain, Ile de France y Romanov sincronizadas con MAP y eCG, la penetrabilidad también aumentó desde el momento de la eCG, pero llegó a un máximo a las 72 h post-eCG, para luego disminuir (Leethongdee y col 2007), sugiriendo que las diferencias en el momento de máxima penetrabilidad podrían deberse a los distintos métodos de sincronización y a las diferentes razas entre otros factores.

En los grupos tratados, la penetrabilidad cervical aumento hasta las 54h post-eCG y se mantuvo durante todo el período experimental. La prolongación en el tiempo de la máxima penetrabilidad cervical en los grupos tratados, podría acarrear un compromiso de la viabilidad del cigoto ya que estaría vencida la primera barrera de protección física. A raíz de esto, podríamos plantear que el tratamiento de inducción a la dilatación cervical se podría adelantar unas horas, para potenciar el momento de la dilatación natural sin prolongar en el tiempo más allá del periodo fisiológico. Anteriormente, otros autores registraron un adelantamiento de la penetrabilidad máxima como respuesta al tratamiento con Misoprostol intravaginal en ovejas sincronizadas con MAP y eCG, registrándose a las 72 h en los controles y a las 54 h en los animales tratados (Leethongdee y col. 2007).

Los datos muestran una diferencia de aproximadamente 1 cm entre los grupos tratados y control en el intervalo intra-tratamiento (42 a 54 h post-eCG). Considerando que Salamon S, Maxwell W. (2000) reportaron que por cada cm de aumento de la penetrabilidad se aumenta aproximadamente en un 10% la fertilidad, podríamos esperar que el aumento de 1 cm en el período intra-tratamiento respecto a los controles repercuta positivamente en un aumento del 10% de fertilidad.

Este es el primer reporte de la utilización de Cb para dilatar el cérvix en ovejas ciclando. Un aumento de la penetrabilidad cervical de aproximadamente 5 cm se obtuvo a las 44 y 54 h post remoción de esponjas de MAP en ovejas ciclando en ovejas tratadas con Ox natural iv respecto a los controles. En nuestro experimento, el aumento de 1 cm de la penetrabilidad entre el grupo tratado con Cb im y el control en el intervalo intra-tratamiento es bastante menor, lo que coincide con una vía de administración más lenta y la utilización de un análogo sintético de larga acción. También ha sido reportado un adelantamiento de la penetrabilidad máxima en ovejas sincronizadas con MAP y eCG pero tratadas con Misoprostol intravaginal, registrándose a las 54 h en los animales tratados y a las 72 h en los controles (Leethongdee y col. 2007). Además, en un estudio preliminar utilizando Dp intravaginal en ovejas sincronizadas con CIDR y eCG, se logró una penetrabilidad total (acceso intrauterino) en el 100% de las ovejas tratadas y del 75% en las controles a las 48 h post eCG (Candappa y col. 2009).

CONCLUSIÓN

Los tratamientos con Cb im y Dp intravaginal en ovejas Corriedale ciclando sincronizadas con MAP y eCG no lograron un aumento significativo de la penetrabilidad cervical al momento de la IATF, pero lograron evitar una caída de la penetrabilidad en el intervalo intra tratamiento, que se tradujo en un atraso del retorno a los valores iniciales de penetrabilidad en las horas siguientes a la IATF. Los datos sugieren que adelantar la aplicación de éstos tratamientos podría favorecer a que se produzca una diferencia significativa de la penetrabilidad al momento de la IATF y no prolongar demasiado el regreso a los valores iniciales de penetrabilidad. El tratamiento combinado de Cb y Dp no potenció la respuesta de cada uno de ellos por separado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Atke A, Vilhardt H. (1987). Uterotonic activity and myometrial receptor affinity of 1-deamino-1-carba-2-tyrosine(O-methyl)-oxytocin. *Acta Endocrinol (Copenh)* 115: 155-160.
2. Campbell JW, Harvey TG, McDonald MF, Sparksman RI. (1996). Transcervical insemination in sheep: An anatomical and histological evaluation. *Theriogenology* 45: 1535-1544.
3. Candappa IB, Bainbridge HC, Price NT, Hourigan KR, Bartlewski PM. (2009). A preliminary study on the suitability of Cervidil to induce cervical dilation for artificial insemination in ewes. *Res Vet Sci* 87: 204-206.
4. Candappa IB, Bartlewski PM. (2012). A review of advances in artificial insemination (AI) and embryo transfer (ET) in sheep, with the special reference to hormonal induction of cervical dilation and its implications for controlled animal reproduction and surgical techniques. *Open Reprod Sci J*, 162-175.
5. Candappa IB, Bartlewski PM. (2014). Induction of cervical dilation for transcervical embryo transfer in ewes. *Reprod Biol Endocrinol* 12 :8.
6. Candappa IB, Bartlewski PM. (2015). Assessing the usefulness of prostaglandin E2 (Cervidil) for transcervical artificial insemination in ewes. *Theriogenology* 84: 1594–1602.
7. Ellwood DA, Mitchell MD, Anderson AB, Turnbull AC. (1980). Specific changes in the in vitro production of prostanoids by the ovine cervix at parturition. *Prostaglandins* 19: 479-488.
8. Falchi L., Taema M., La Clanche S., Scaramuzzi R.J. (2012). The pattern of cervical penetration and the effect of topical treatment with prostaglandin and/or FSH and oxytocin on the depth of cervical penetration in the ewe during the peri-ovulatory period. *Theriogenology* 78: 376-384.
9. Fierro S, Gil J, Viñoles C, Olivera-Muzante J. (2013). The use of prostaglandins in controlling estrous cycle of the ewe: a review. *Theriogenology* 79: 399-408.
10. Fuchs AR, Graddy LG, Kowalski AA, Fields MJ. (2002). Oxytocin induces PGE2 release from bovine cervical mucosa in vivo. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 70: 119-129.
11. Gil J., Fierro S., Bielli A. (2005). Efecto de la oxitocina y vía de administración sobre la penetrabilidad del cervix en ovejas en estro. XXXIII Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay, p. 186-187.

12. Gilbert CL1, Jenkins K, Wathes DC. (1991). Pulsatile release of oxytocin into the circulation of the ewe during oestrus, mating and the early luteal phase. *J Reprod Fertil* 91:337-346.
13. Gorodeski GI. (1996). The cervical cycle. En: Adashi EY, Rock JA, Rosenwaks Z. *Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology*. Philadelphia, Lippincott-Raven, pp. 301-324.
14. Halbert GW, Dobson H, Walton JS, Buckrell BC. (1990a). The structure of the cervical canal of the ewe. *Theriogenology* 33: 977-992.
15. Halbert GW, Dobson H, Walton JS, Buckrell BC. (1990b). A technique for transcervical intrauterine insemination of the ewes. *Theriogenology* 33: 993-1010.
16. Hauksson A, Akerlund M, Melin P. (1988). Uterine blood flow and myometrial activity at menstruation, and the action of vasopressin and a synthetic antagonist. *Br J Obstet Gynaecol* 95(9):898-904.
17. Houdeau E, Raynal P, Marnet PG, Germain G, Mormède P, Rossano B, Monnerie R, Prud'homme MJ. (2002). Plasma levels of cortisol and oxytocin, and uterine activity after cervical artificial insemination in the ewe. *Reprod Nutr Dev* 42: 381-392.
18. I.N.I.A. (2011). Programa Nacional de Investigación Producción de Carne y Lana. Disponible en: <http://www.inia.org.uy/online/site/31583811.php> Fecha de consulta: 23-11-16.
19. Kershaw CM, Khalid M, McGowan MR, Ingram K, Leethongdee S, Wax G, Scaramuzzi RJ. (2005). The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology* 64: 1225-1235.
20. King ME, McKelvey WA, Dingwall WS, Matthews KP, Gebbie FE, Mylne MJ, Stewart E, Robinson JJ. (2004). Lambing rates and litter sizes following intrauterine or cervical insemination of frozen/thawed semen with or without oxytocin administration. *Theriogenology* 62: 1236-1244.
21. Ledger WL, Ellwood DA, Taylor MJ. (1983). Cervical softening in late pregnant sheep by infusion of prostaglandin E-2 into a cervical artery. *J Reprod Fertil* 69: 511-515.
22. Leethongdee S, Kershaw-Young CM, Scaramuzzi RJ, Khalid M. (2010). Intra-cervical application of Misoprostol at estrus alters the content of cervical hyaluronan and the mRNA expression of follicle stimulating hormone receptor (FSHR), luteinizing hormone receptor (LHR) and cyclooxygenase-2 in the ewe. *Theriogenology* 73: 1257-1266.

23. Leethongdee S, Khalid M, Bhatti A, Ponglowhapan S, Kershaw CM, Scaramuzzi RJ. (2007). The effects of the prostaglandin E analogue Misoprostol and follicle-stimulating hormone on cervical penetrability in ewes during the peri-ovulatory period. *Theriogenology* 67: 767-777.
24. M.G.A.P. (2015). Anuario Estadístico Agropecuario; 2015. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/unidad-ejecutora/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/publicaciones/anuarios-diea/anuario2015>. Fecha de consulta: 23-11-16.
25. M.G.A.P-DI.CO.SE. (2015). Dirección de Contralor de Semovientes. Declaración jurada 2015, Total Nacional, Disponible en: http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/multimedia/1360_DJ2015_TotalNacional.pdf. Fecha de consulta: 23-11-16.
26. Moré J. (1984). Anatomy and histology of the cervix uteri of the ewe: new insights. *Acta Anat (Basel)* 120: 156-159.
27. Naqvi S, Joshi A, Bag S, Mittal JP (1998). Cervical penetration and transcervical AI of tropical sheep (Malpura) at natural estrus using frozen-thawed ram semen. *Small Ruminant Res* 29: 329-33.
28. Olivera-Muzante J, Fierro S, López V, Gil J. (2011). Comparison of prostaglandin- and progesterone-based protocols for timed artificial insemination in sheep. *Theriogenology* 75: 1232-1238.
29. Owiny JR, Fitzpatrick RJ. (1990). Effect of intravaginal application of prostaglandin E2 gel on the mechanical properties of the ovine cervix uteri at term. *Am J Obstet Gynecol* 163: 657-660.
30. Robinson JJ, McKelvey WA, King ME, Mitchell SE, Mylne MJ, McEvoy TG, Dingwall WS, Williams LM. (2011). Traversing the ovine cervix - a challenge for cryopreserved semen and creative science. *Animal* 5: 1791-1804.
31. Rodríguez-Piñón M. (2015). Estudios endócrinos y moleculares en el Cervix ovino durante el Ciclo Estral y el Anestro Estacional. Tesis de Doctorado. Facultad de Veterinaria, UdelaR, 66 p.
32. Rodríguez-Piñón M. (2003). Importancia del cervix ovino como barrera para la Inseminación Artificial. En: Unguerfeld R. Reproducción de los Animales Domésticos. Montevideo, Melibea, V 2, pp. 353-364.
33. Rodríguez-Piñón M. (2006). Receptores de las hormonas esteroideas sexuales en cervix ovino. Estudios en corderas pre-púberes y en ovejas adultas durante el ciclo estral natural e inducido. Tesis de Maestría. Facultad de Veterinaria, UdelaR, 50 p.
34. Russel A, Doney J, Gunn R. (1969). Subjective assessment of body fat in the live sheep. *J Agr Sci* 72: 451-454.
35. Salamon S, Maxwell W. (2000). Storage of ram semen. *Anim Rep Sci* 62: 77-111.

36. Sayre BL, Lewis GS. (1996). Cervical dilation with exogenous oxytocin does not affect sperm movement into the oviducts in ewes. *Theriogenology* 45:1523-1533.
37. Sayre BL, Lewis GS. (1997). Fertility and ovum fertilization rate after laparoscopic or transcervical intrauterine artificial insemination of oxytocin-treated ewes. *Theriogenology* 48: 267-275.
38. Shemesh M, Dombrovski L, Gurevich M, Shore LS, Fuchs AR, Fields MJ. (1997). Regulation of bovine cervical secretion of prostaglandins and synthesis of cyclooxygenase by oxytocin. *Reprod Fertil Dev* 9: 525-530.
39. Stellflug JN, Wulster-Radcliffe MC, Hensley EL, Cowardin EA, Seals RC, Lewis GS. (2001). Oxytocin-induced cervical dilation and cervical manipulation in sheep: effects on laparoscopic artificial insemination. *J Anim Sci* 79: 568-573.
40. Wathes DC, Guldenaar SE, Swann RW, Webb R, Porter DG, Pickering BT. (1986). A combined radioimmunoassay and immunocytochemical study of ovarian oxytocin production during the periovulatory period in the ewe. *J Reprod Fertil* 78: 167-183.
41. Windsor DP, Széll AZ, Buschbeck C, Edward AY, Milton JTB, Buckrell BC. (1994). Transcervical artificial insemination of Australian Merino ewes with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 42: 147-157.
42. Word R, Li X, Hnat M, y col. (2007). Dynamics of cervical remodeling during pregnancy and parturition: mechanisms and current concepts. *Semin Reprod Med* 25: 69-79.
43. Wu WX, Coksaygan T, Chakrabarty K, Collins V, Rose JC and Nathanielsz PW. (2005). Sufficient progesterone-priming prior to estradiol stimulation is required for optimal induction of the cervical prostaglandin system in pregnant sheep at 0.7 gestations. *Biol Reprod* 73: 343-350.
44. Wulster-Radcliffe MC, Lewis GS. (2002). Development of a new transcervical artificial insemination method for sheep: effects of a new transcervical artificial insemination catheter and traversing the cervix on semen quality and fertility. *Theriogenology* 58: 1361-1371.
45. Wulster-Radcliffe MC, Wang S, Lewis GS. (2004). Transcervical artificial insemination in sheep: effects of a new transcervical artificial insemination instrument and traversing the cervix on pregnancy and lambing rates. *Theriogenology* 62: 990-1002.
46. Zobel R, Taponen J. (2014). Denaverine hydrochloride and carbetocin increased welfare during and after parturition and enhanced subsequent fertility in cattle. *J Dairy Sci* 97: 3570–3577.