



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

UTILIZACION DE UN DISPOSITIVO INTRAVAGINAL (ESPONJA) Y FLORA
BACTERIANA VAGINAL: CONTROL CON ANTIBIÓTICOTERAPIA Y ATRACTIVIDAD
SEXUAL EN OVINOS

Dr. Marcelo Gatti Assandri

TESIS DE MAESTRÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL
URUGUAY



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados

UTILIZACION DE UN DISPOSITIVO INTRAVAGINAL (ESPONJA) Y FLORA
BACTERIANA VAGINAL: CONTROL CON ANTIBIÓTICOTERAPIA Y ATRACTIVIDAD
SEXUAL EN OVINOS

Dr. Marcelo Gatti Assandri

Dr. Rodolfo Ungerfeld M.Sc., Ph.D

Director de Tesis

Dr. Pablo Zunino M.Sc., Ph.D.

Co - Director de Tesis

2010

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE
DEFENSA DE TESIS

LZMV Lorenzo Alvarez-Ramírez M.Sc. PhD.

Facultad de Veterinaria, UNAM, México

Presidente

DMTV Raquel Pérez-Clariget M.Sc. PhD.

Facultad de Agronomía (UdelaR) y Programa de Posgrados de
Facultad de Veterinaria (UdelaR)

DMTV Alejo Menchaca M.Sc. PhD.

Instituto de Reproducción Animal del Uruguay y Programa de
Posgrados de Facultad de Veterinaria (UdelaR)

“Todo el mundo elogia la victoria en la batalla, pero lo verdaderamente deseable es poder ver el mundo de lo sutil y darse cuenta del mundo de lo oculto, hasta el punto de ser capaz de alcanzar la victoria donde no existe forma.”

Sun Tzu

AGRADECIMIENTOS

A Rodolfo Ungerfeld por su perseverancia y dedicación en la formación académica de todos sus tesis; por confiar, motivar y estar de continuo empujando para que apuntemos a lo más alto posible en nuestros trabajos.

A Pablo Zunino por su colaboración y valiosos aportes en la realización de esta tesis, así como la realización de las pruebas bacteriológicas.

A Fernando Perdigón y Alberto Salazar por la colaboración y disposición para realizar los ensayos en el Campo Experimental de Mígues.

A Cecilia Olivera y Maria Noel Castro por la colaboración en la realización de los ensayos de campo.

A Eloisa Pettinari por su colaboración y soporte técnico en la determinación analítica y el lavado de las esponjas.

A Laboratorios Santa Elena S.A. y Fundaciba por la financiación de esta tesis.

A todos los integrantes del Laboratorio de Fisiología de la Reproducción por sus valiosos aportes en la elaboración de esta tesis.

A los amigos que nunca entienden el afán de seguir estudiando, y a los que sí lo entienden.

A mis padres, hermanos y familia en general por el apoyo y la motivación en mi desarrollo personal y profesional.

A los que ya no están, pero siempre sumaron y sumarán desde donde estén.

A Gabriela por su apoyo incondicional, su paciencia y por estar siempre allí.

A todos los que de una u otra forma han acompañado en este camino, muchas gracias.

LISTADO DE ABREVIATURAS

eCG	Gonadotropina coriónica equina
FGA	Acetato de fluorogestona
FSH	Hormona folículo estimulante
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
h	hora
hCG	Gonadotropina coriónica humana
LH	Hormona luteinizante
MAP	Acetato de medroxiprogesterona
mL	mililitros
PBS	Solución buffer fosfatada
PGF ₂ α	Prostaglandina F ₂ α
SNC	Sistema nervioso central
UFC / FCU	Unidades formadoras de colonias

INDICE

Resumen	vii
Abstract	ix
1. Introducción	1
1.1 Situación de la producción ovina nacional	1
1.1.1 Indicadores productivos	1
1.1.2 Enfoques productivos en los sistemas ovinos en Uruguay	3
1.2 Fisiología de la reproducción en la oveja	4
1.2.1 Estacionalidad reproductiva	4
1.2.2 Ciclo estral	6
1.2.3 Control de la conducta de estro	7
1.2.4 Interés en la regulación del ciclo estral	8
1.2.5 Atractividad sexual	8
1.3 Sincronización de celos	10
1.3.1 Acetato de medroxiprogesterona	11
1.3.2 Regulación esteroidea de la flora vaginal	11
1.3.3 Problemas asociados al uso de implantes intravaginales	12
1.3.4 Vaginitis	13
2. Hipótesis	15
3. Objetivos generales	16
3.1. Objetivos específicos	16
4. Experimentos 1 y 2	17
4.1 Introducción	17
4.2 Objetivos específicos	18

4.3 Materiales y métodos	19
4.3.1 Animales y metodología	19
4.3.2 Experimento 1	19
4.3.3 Experimento 2	19
4.3.4 Colección de muestras y determinación bacteriológica	20
4.3.5 Análisis estadístico	20
4.4 Resultados	21
4.5 Discusión	23
5. Experimento 3 y 4	24
5.1 Introducción	24
5.2 Objetivos específicos	25
5.3 Materiales y métodos	26
5.3.1 Animales y metodología	26
5.3.2 Experimento 3	26
5.3.3 Experimento 4	26
5.3.4 Test de atractividad	26
5.3.5 Análisis estadístico	27
5.4 Resultados	28
5.4.1 Experimento 3	28
5.4.2 Experimento 4	28
5.5 Discusión	30
6. Discusión general	32
7. Conclusiones	34
8. Bibliografía	35

UTILIZACION DE UN DISPOSITIVO INTRAVAGINAL (ESPONJA) Y FLORA
BACTERIANA VAGINAL: CONTROL CON ANTIBIÓTICOTERAPIA Y
ATRACTIVIDAD SEXUAL EN OVINOS.

Autor: Dr. Marcelo Gatti Assandri

Orientador: Dr. Rodolfo Ungerfeld, M.Sc., PhD., Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria

Co-orientador: Dr. Pablo Zunino, M.Sc., PhD., Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Resumen

La presente tesis incluye cuatro ensayos, los que tuvieron como objetivo general determinar los efectos del uso de dispositivos intravaginales de sincronización de celo (esponjas) impregnados con acetato de medroxiprogesterona (MAP) sobre la flora vaginal en ovinos, las posibles alternativas para el control de dichas alteraciones, y las posibles alteraciones del comportamiento sexual que puedan ser causadas por su uso. En el primer ensayo se demostró que no existen diferencias en la dinámica de la población de bacterias vaginales aerobias cultivables (conteos bacterianos vaginales referidos a unidades formadoras de colonias [UFC]) entre animales tratados con dispositivos intravaginales comerciales (50 mg de MAP) y dispositivos sin MAP. En un segundo ensayo se demostró que los conteos de UFC al momento de retirar las esponjas aumentaron en animales con y sin tratamiento antibiótico, aunque el aumento fue significativamente menor en los grupos con tratamiento antibiótico ya sea sistémico o local. Además se demostró que los animales con tratamiento antibiótico local (en la propia esponja) fueron los que tuvieron un incremento menor de los conteos de UFC al momento de retirar las esponjas, aunque todos los grupos del ensayo volvieron a conteos similares a los observados antes de comenzar el tratamiento a los 3 días del retiro de las esponjas. En el tercer y cuarto ensayo se constató que las hembras con celo espontáneo resultaron ser más atractivas para los carneros que las hembras con un pretratamiento con esponjas, y que no hubo diferencias significativas entre grupos de animales tratados con esponjas comerciales con antibiótico local y sin antibiótico local. En resumen los ensayos realizados permitieron concluir que: 1) las esponjas de por sí (independientemente del contenido de MAP) desencadenan el mayor aumento de UFC; 2) el antibiótico local es más efectivo que el tratamiento con antibiótico sistémico para controlar el aumento de la flora vaginal provocada por la inserción de la esponja; 3) las ovejas con celo espontáneo son más atractivas para los carneros que aquellas pretratadas

con esponjas; y 4) el uso de antibióticos locales no hace más atractivas a las ovejas tratadas con esponjas.

Abstract

The present thesis includes four trials, with the general aim of determining the effects of intravaginal sponges impregnated with medroxyprogesterone acetate (MAP) used for estrus synchronization on the vaginal bacterial flora in ewes, possible alternatives for the control of these changes, and identifying possible alterations of sexual behavior that may be caused by their use. In the first trial it was demonstrated that there are not significant differences on the vaginal bacteria dynamics (considered as the number of vaginal colony forming units [CFU]) in animals treated with commercial intravaginal sponges (50 of MAP) and sponges without MAP. In a second study it was demonstrated that CFU values increased in groups of animals with and without antibiotic treatment at sponge withdrawal, but the increase was significantly lower in the groups with antibiotic treatment, either systemic or locally administered. Also it has been shown that animals with local antibiotic treatment (in the sponge) had a smaller increase in CFU values at withdrawal, but CFU values returned to values similar to those observed before treatment within 3 days of sponge withdrawal in all the groups. In the third and fourth trials, it was observed that ewes with spontaneous estrus were more attractive for rams than ewes with a pre-treatment with sponges, and there were not significant differences between groups of animals treated with or without local antibiotic in the sponges. In summary it was concluded that: 1) the sponges per se triggered the largest increase of UFC; 2) local antibiotic is more effective than systemic antibiotic treatment to control the increase of the vaginal bacterial numbers caused by the insertion of the sponge; 3) the ewes with spontaneous estrus are more attractive to rams than those pretreated with sponges; and 4) the use of local antibiotics did not increase the attractiveness of ewes treated with sponges.

1. Introducción

1.1. Situación de la producción ovina nacional

1.1.1. Indicadores productivos

La producción ovina en el Uruguay representa la principal fuente de ingresos a nivel familiar de los pequeños y medianos productores (57%), originando más del 20% del producto bruto agropecuario en aproximadamente 24.000 establecimientos (Montossi, 2000; DICOSE, 2008). El sector da empleo a más de 50.000 personas considerando al agro y la industria conjuntamente (Bonino, 2003).

La producción internacional de lana para la zafra 2008/2009 continúa la tendencia decreciente, al igual que la cantidad de ovinos en el país. La conjunción de precios altos de la carne y un valor bajo de la lana explican en gran parte la tendencia a disminuir las existencias ovinas. A nivel internacional, en 2009 hubo una lenta pero continua recuperación de la demanda después de la crisis del 2008. La faena de corderos disminuyó internacionalmente en un 2,2%, y su valor en 8% (Tambler, 2009).

En Uruguay se registró una nueva caída de la cantidad de animales en el 2009 del entorno del 5,3%, ubicándose en 8,9 millones de animales (500.000 menos que en el 2008) (Figura 1). Esta caída se explica parcialmente por la elevada faena, 10% superior que la zafra anterior (Tambler, 2009). En 2009 la producción de lana descendió en Uruguay de 37 a 34 mil toneladas, 8,2% menor que en la zafra 2008. Pero para los registros del SUL, en el 2009 las exportaciones se ubicaron en 49,7 millones de kilos de lana base sucia, 10,9% menos que en la zafra anterior (la diferencia entre producido y exportado es debida a la importación de lana). Las ventas de lana sucia disminuyeron un 14,5% y la lana lavada un 54,5%, y los tops aumentaron 1,8% comparado con 2008. La participación en las exportaciones se modificó aumentando los tops del 63% al 72%, disminuyendo la lana lavada y la lana sucia del 17,0% al 8,6%, y del 20,0 al 14,5% respectivamente. En términos de valor real, las exportaciones bajaron un 27,3% respecto a 2008, para noviembre del 2009 se llevaban 170,2 millones de dólares en exportaciones de lana. China fue el principal destino de la lana uruguaya representando el 96,5 % de las exportaciones de lana sucia, 50,7% de lavada y 47,3% de los tops. En el mercado interno, el precio de la lana disminuyó un 22,4% respecto a la zafra anterior (Laguna, 2009).

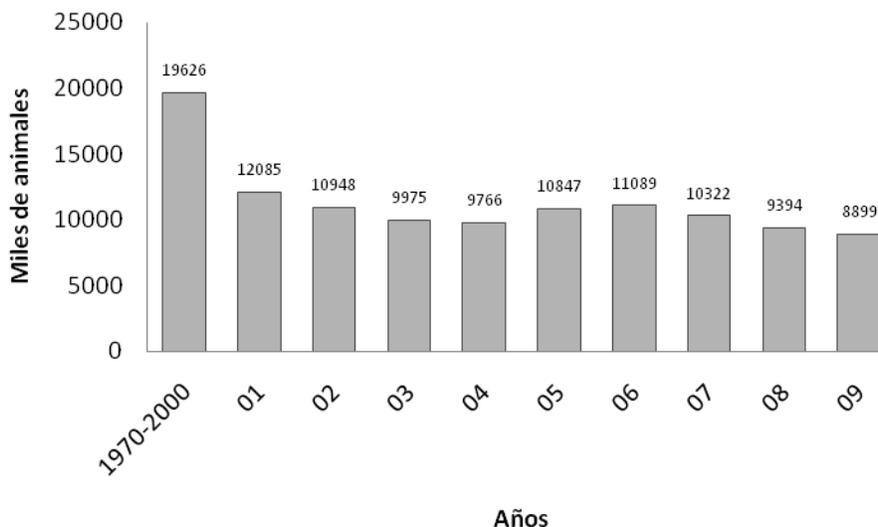


Figura 1. Evolución del stock ovino en Uruguay desde el año 2000 al 2009, según datos de DICOSE (1970-2000). Fuente: SUL.

La producción de carne ovina aumentó y la faena 2009 se ubicó en 1.8 millones de cabezas o sea un 7,1% más que la zafra anterior. La faena de borregos y corderos aumentó en 43% y 19% respectivamente, y la faena de ovejas bajó 17%. La producción total de carne 08/09 fue de 132,5 mil toneladas aumentando 1,2% contra 2007/2008 (Figura 2). Pero en términos económicos, si bien para octubre 2009 se igualó el precio del 2008, en términos reales se registró una caída del 18 al 20% en carne posdressing. Las exportaciones de carne fueron en 2009 de 24 mil toneladas de equivalente peso carcasa, aumentando 24% contra 2008, pero nuevamente el precio de las exportaciones bajó un 14%. Por lo tanto, medido en valor real, las exportaciones crecieron solo un 6%. Se exportaron 58 millones de dólares y se prevé superar en la zafra 2010 el record histórico de 70,7 millones. Han aumentado notoriamente la participación de mercados como Unión Europea y Brasil (44% en valor y 53% en volumen), así como Arabia Saudita y Jordania (Tambler, 2009).

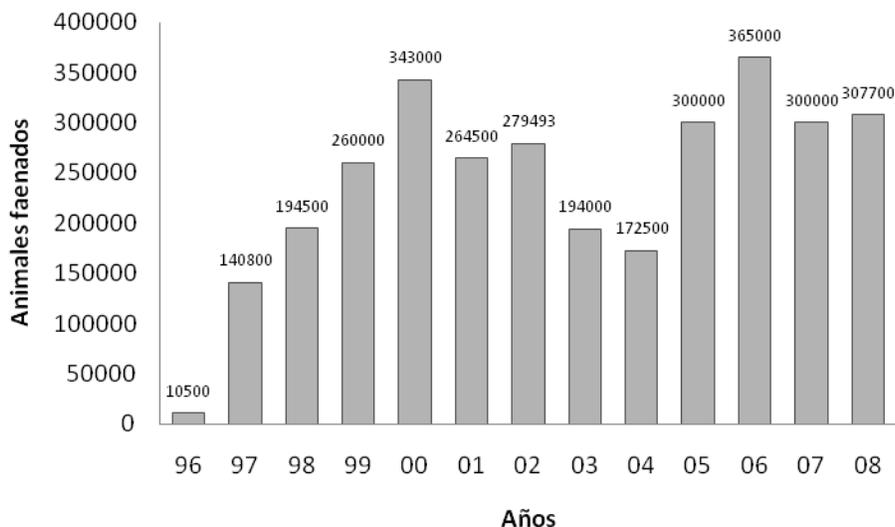


Figura 2. Evolución de los animales faenados en Uruguay, como corderos pesados, desde 1996 a 2008 según Secretariado Uruguayo de la Lana. Fuente: SUL

1.1.2. Enfoques productivos en los sistemas ovinos en Uruguay

Históricamente la producción ovina del Uruguay tenía un enfoque netamente lanero. En los últimos años varios factores a nivel mundial han determinado que el precio de la lana disminuyera drásticamente, lo que sumado a otros acontecimientos que influyeron positivamente en el mercado de carne, han llevado a que la relación de precios de lana vs carne haya variado, por lo que actualmente resulte más eficiente económicamente la producción de carne ovina. Contrariamente a los sistemas laneros, los sistemas carniceros dependen en gran medida de los resultados reproductivos y del crecimiento del animal, mientras que la producción y características de la lana tienen una baja incidencia. Estos sistemas tienen como principal producción la carne de calidad proveniente de animales jóvenes (Montossi, 2000).

La situación de Uruguay ante los mercados de carne, y particularmente de aquellos de alto poder adquisitivo, genera una gran oportunidad de crecimiento. Para poder acceder a estas mejoras, el sistema agroindustrial debe emprender una serie de ajustes estructurales y cambios en tecnologías de producción que permitan satisfacer los requerimientos más exigentes en calidad y cantidad de carne (Cardellino, 2002). La baja eficiencia reproductiva de la majada es una de las limitantes que deben encararse para reactivar y expandir la producción, ya que de acuerdo a los resultados históricos, en nuestro país se necesitan casi 2 ovejas para producir un cordero (Cardellino, 2002) (Figura 3).

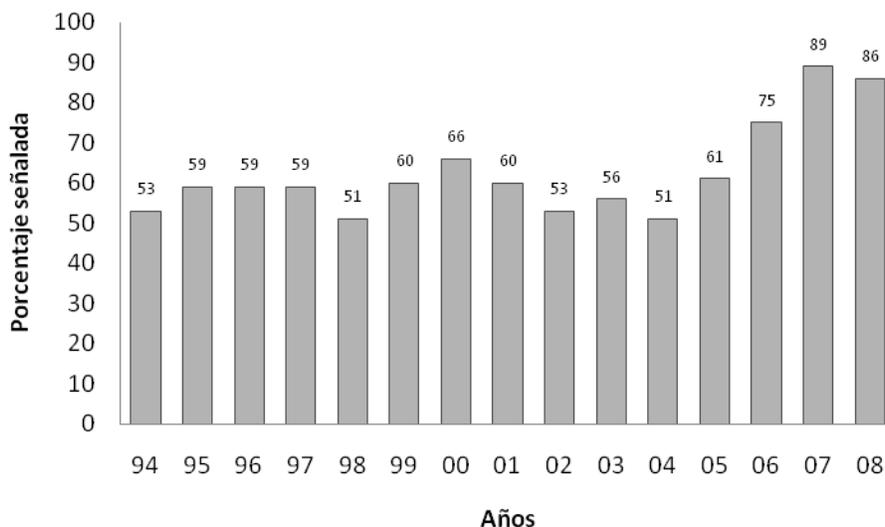


Figura 3. Evolución del porcentaje de señalada en Uruguay desde el año 1994 al 2008. Fuente DICOSE 2008.

1.2. Fisiología reproductiva de la oveja

1.2.1. Estacionalidad reproductiva

El sistema nervioso central (SNC), el hipotálamo, la hipófisis y las gónadas constituyen el eje gonadotrófico. A su vez, las hormonas producidas en los ovarios, como el estradiol tienen acción de retroalimentación sobre el hipotálamo regulando así la liberación de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y por lo tanto la secreción de gonadotropinas por parte de la adeno-hipófisis. Los factores ambientales complementan este sistema de control incidiendo sobre la función reproductiva. Estos factores ambientales son tanto la duración del día, como la temperatura, la lluvia, la disponibilidad de alimentos, así como la densidad poblacional, o los estímulos socio-sexuales. La información sobre los cambios ambientales se transmite a través del SNC y modifica las funciones hipotalámicas e hipofisarias produciendo respuestas endócrinas determinadas o específicas (Bronson, 1988; Forsberg, 2002).

La variación anual de las horas de luz en el día, influye en la estacionalidad reproductiva de varias especies de mamíferos, tanto en zonas polares como en zonas templadas. La glándula pineal – un pequeño cuerpo situado en el cerebro de la mayoría de los vertebrados - es la responsable de procesar la información relativa al fotoperiodo (Arendt, 1986; Forsberg, 2002). Su función es la de mediar la respuesta a la luz y la oscuridad ambiental, y en algunas especies actúa como reloj biológico para sincronizar los ciclos circadianos (Arendt, 1986; Forsberg, 2002).

Buena parte de los organismos superiores presentan reproducción estacional como respuesta evolutiva a las variaciones climáticas y a la disponibilidad de alimentos. La selección natural ha influido para que en muchas especies la reproducción se sincronice de tal forma que las pariciones se concentren en el momento más ventajoso del año. La existencia de la “estación reproductiva” confiere la posibilidad de que la mayor cantidad de partos se concentre en la primavera, siendo esta la estación más favorable para la madre y su cría por las ventajas en la alimentación y el clima, facilitando una mejor condición para sobrellevar la lactación (Arendt, 1986; Forsberg 2002). Para que la mayor parte de las pariciones de produzcan en la primavera las especies han generado diferentes estrategias reproductivas. Especies como el zorro (*Lycalopex gymnocercus*) son sexualmente inactivas durante gran parte del año pero presentan cortos periodos de gestación de tal forma que las pariciones se concentran en la primavera. Especies como la oveja, se reproducen durante el verano y el otoño y tienen periodos de gestación más largos que las anteriores, de forma que la mayor cantidad de pariciones se produce en la primavera siguiente (Bronson 1988; Jainudeen, 1992; Forsberg, 2002).

Dado que los cambios estacionales en la duración del día alteran la función gonadal, la información debe pasar por el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal. La información lumínica es transmitida desde las células de la retina del ojo, vía los nervios ópticos al núcleo supraquiasmático, localizado en el hipotálamo anterior. La información que sale del núcleo supraquiasmático, particularmente la referida a la medición del tiempo de fotoperíodo, es transmitido vía el núcleo paraventricular y el ganglio cervical superior a la glándula pineal. La señal liberada por la glándula pineal en respuesta al fotoperíodo es endócrina, a través de la secreción de la hormona melatonina, la que regula la actividad hipotálamo-hipófiso-gonadal (Ortavant et al., 1985).

Las ovejas, como otras especies presentan una estación reproductiva de “*día corto*”. Por lo tanto en la época del año en que las horas de luz al día disminuyen, la especie manifiesta actividad cíclica, con una duración promedio de 17 días en cada ciclo. Existe otro periodo del año en que no ciclan, no manifiestan celo ni ovulan, conocido como “anestro estacional” (Jainudeen, 1992). Es importante señalar que el grado en que se correlacionan la actividad e inactividad reproductiva con los estímulos del fotoperíodo varía entre especies (Goodman, 2006).

El comienzo de la actividad reproductiva se caracteriza por un incremento en la frecuencia de pulsos de la hormona luteinizante (LH) secretada por la hipófisis. La concentración de la hormona folículo estimulante (FSH) en sangre, que es secretada en forma pulsátil, también se incrementa en este momento. Los niveles elevados de gonadotrofinas tienen dos efectos principales: inician la maduración de las células germinales y estimulan la producción esteroidea de las gónadas. Cuando se aproxima la estación reproductiva el eje hipotalámico-hipofisario comienza a hacerse menos sensible a la inhibición de los

esteroides. Esto aumenta la tasa de descarga del generador de pulsos de GnRH (ver revisión: Forsberg, 2002).

La duración de la estación reproductiva varía según las diferentes razas y también depende de factores como la localización geográfica, latitud en que se haya desarrollado, condiciones climáticas y estado nutricional (Forsberg, 2002). No obstante la oveja posee la capacidad reproductiva de presentar ciclos estrales durante todo el año si se le somete a condiciones ambientales artificialmente controladas como el control mediante luz artificial. El determinante para la estación reproductiva de esta especie es el cambio en la cantidad diaria de horas luz (ver revisión: Ungerfeld, 2001).

1.2.2. Ciclo estral

El ciclo estral de los ovinos resulta de la interacción coordinada de diversas estructuras: hipotálamo, hipófisis, ovarios y útero. Por lo tanto, para comprender el control de este ciclo se debe analizar la comunicación entre estos tejidos. Ésta ocurre gracias a la acción de hormonas: GnRH del hipotálamo, LH y FSH de la hipófisis, estradiol, inhibina y progesterona del ovario, y prostaglandina F2 α (PGF2 α) del útero y del cuerpo lúteo (Ungerfeld, 2002; Goodman, 2006). El hipotálamo es el centro donde se integra y procesa la información tanto procedente del SNC (sistema de neurotransmisores y péptidos opioides endógenos), como del exterior (luz, estímulos olfatorios, etc) y del ovario (hormonas ováricas). El resultado de esta integración es la regulación de la secreción de la GnRH (Goodman, 2006).

La GnRH es sintetizada en núcleos de neuronas localizadas en dos zonas del hipotálamo: región pre-óptica anterior (núcleo pre-óptico y supraquiasmático) y la región arcuada (núcleo arqueado y ventromedial). Desde estas zonas la GnRH pasa vía axones terminales a la eminencia media del hipotálamo, para posteriormente pasar a la circulación porta y ser liberada en la adenohipófisis. La GnRH se une a los receptores de las células gonadotropas hipofisarias regulando la secreción de gonadotropinas (Goodman, 2006).

El ciclo estral comprende dos fases: la fase luteal, que se extiende desde el día 2-3 (celo= día 0) del ciclo, hasta alrededor del día 13; y la fase folicular que se extiende desde la luteólisis (regresión del cuerpo lúteo) que se produce el día 13 hasta el día 2 (Ungerfeld, 2002).

Durante el estro se observa el comportamiento de cortejo, el que es comúnmente seguido de la monta y cópula, con la ocurrencia de varias cópulas durante un mismo periodo de estro. En general el estro de la oveja dura 24 - 36 h, aunque en razas con altas tasas de ovulaciones puede ser hasta 50% más prolongado (Goodman, 2006). La duración del estro es influenciada también por la presencia y actividad sexual de los carneros, reportándose diferencias en el largo del mismo por exposición continua o intermitente a los mismos

(Jainudeen, 1992; Goodman, 2006). La ovulación se produce 24 a 30 h después del comienzo de la conducta de estro. Debido a esto, el inicio del estro se utiliza normalmente como marcador pautando los acontecimientos del ciclo estral, y por convención, el primer día del estro ha sido designado como día 0 del ciclo estral (Goodman, 2006).

1.2.3. Control de la conducta de estro

En los ovinos, en condiciones fisiológicas tanto la progesterona como el estradiol son necesarios para la inducción de la conducta de estro. El tratamiento únicamente con estradiol puede producir el estro, pero en ausencia de progesterona previa al tratamiento no se presenta estro, se necesita un incremento a dosis muy altas de ésta para que se presente normalmente el estro (Goodman, 2006). La progesterona antes del tratamiento aumenta la sensibilidad a los estrógenos y la intensidad del comportamiento de celo. Esta acción de la progesterona es favorecida por un tratamiento concomitante con estrógenos y generalmente requiere una prolongada exposición (al menos 6 días), aunque los tratamientos que se limitan a cinco días son igualmente eficaces en las ovejas en anestro (Robinson, 1967; Ungerfeld, 2002; Goodman, 2006). El estradiol es también esencial para el comportamiento sexual: concentraciones de estradiol de 3 pg/mL son suficientes para inducir el estro (Goodman, 2006). Concentraciones de estradiol mayores disminuyen la latencia al estro, al tiempo que aumenta la actividad de búsqueda de los carneros a las ovejas. Tanto la alta concentración de progesterona antes del aumento del estradiol como la secreción máxima del mismo, son necesarios para la sincronización del estro con el pico de LH pre-ovulatorio. La progesterona disminuye la latencia al estro, pero aumenta la del pico de LH, ocurriendo en medio del aumento de estradiol preovulatorio, completando la sincronización (Goodman, 2006). Por último, el descenso de la concentración de estradiol en el momento del pico de LH es importante para la culminación del estro, porque al prolongar el tratamiento con estrógenos se duplica la duración. La relación temporal entre la progesterona y estradiol durante el ciclo estral es fundamental para el inicio del estro (Goodman, 2006). En contraste con los efectos positivos del pre-tratamiento con progesterona, cuando la progesterona es administrada simultáneamente con estrógenos bloquea el comportamiento del estro. El tratamiento con estrógenos es altamente efectivo si se administra 1-2 días después del cese de la exposición a la progesterona, pero su potencia disminuye gradualmente con el tiempo después del tratamiento con progesterona. Por lo tanto, el patrón ideal de esteroides para la inducción del estro en la oveja es un período prolongado de progesterona elevada seguido por una caída de la progesterona y el aumento de estradiol por los próximos 1-2 días. Un patrón muy similar se observa durante la fase folicular de la especie ovina (Jainudeen, 1992; Goodman, 2006).

La primera ovulación de la estación reproductiva no se acompaña de la conducta de estro debido a la falta de la previa acción de la progesterona. Al final de la misma, el estro no se

produce después de la última luteólisis dado que las concentraciones de estradiol no aumentan (Goodman, 2006).

1.2.4. Interés en la regulación del ciclo estral

Existe una serie de técnicas y tecnologías asociadas al manejo reproductivo que ayudan a mejorar la producción ovina. Una opción de manejo es sincronización de celos, siendo comúnmente utilizadas esponjas intravaginales con progestágenos por periodos cortos asociados a gonadotrofina coriónica equina (eCG) para la inducción de celo. La sincronización e inducción de celos es parte de este paquete tecnológico de alternativas para incrementar el desempeño reproductivo y con ello la producción de carne (Rubianes et al., 2002).

En Uruguay existe una marcada estacionalidad de la producción ovina, con encarneradas largas centradas en el otoño y pariciones distribuidas a lo largo de dos meses. La implementación de tecnologías que permiten manejar concentraciones de servicios y regular la época de encarnerada, ofrece beneficios productivos y oportunidades de acceso a otros mercados. La mayor concentración de las pariciones facilita las tareas de control en el momento de los partos y uniformiza la edad de los corderos, favoreciendo el manejo de los mismos, así como la homogeneidad de los grupos de animales (Bonino, 2003).

Por otra parte la producción de corderos fuera de la época tradicional de partos ofrece la oportunidad de ofertar al mercado corderos todo el año, y acceder a mejores precios en épocas de escasez de los mismos. Asimismo y no de menor importancia, permite acortar periodos entre el parto y la concepción, pudiendo obtenerse un aumento del número de partos por animal a lo largo de su vida. Por todo lo anterior, son técnicas muy atractivas para el manejo de planteles en cabañas, ya que permiten manejar y concentrar la época de pariciones, determinando fechas de partos y optimizando su edad para llevarlos a presentación en exposiciones (Rubianes et al., 2002).

1.2.5. Atractividad sexual

El estro es el momento en que la hembra es receptiva a la monta por parte del macho. Para que esto ocurra es necesario una interacción y cambios en los niveles de algunas hormonas esteroideas: deben disminuir las concentraciones de progesterona (final de fase luteal), y aumentar las de estrógenos. Como ya se explicó, en la oveja no se produce la manifestación de estro sin el impacto previo de concentraciones altas de progesterona. La única forma de lograr un comportamiento de estro sin el “priming” de progesterona, es administrando dosis muy elevadas de estrógenos, fuera de los rangos que se presentan fisiológicamente (Ungerfeld, 2002). A su vez, dosis muy elevadas de E2 producen efectos inhibitorios del crecimiento folicular (Ungerfeld et al., 2004).

El concepto de “comportamiento sexual femenino” incluye tres comportamientos distintos: receptividad, atractividad y proceptividad (Beach, 1976). De acuerdo a este autor, la aceptación de la monta por parte del macho es la receptividad; la proceptividad se define como el comportamiento sexual activo por parte de la hembra; y la atractividad es consecuencia de factores que hacen diferente a una hembra de otra, generando mayor o menor atracción a los machos. Sin embargo, existe escasa información sobre las vías de comunicación que determinan la atractividad en la oveja.

Existen señales olfatorias que son liberadas al ambiente por parte de un individuo, que generan una reacción y estimulan cambios fisiológicos de otros individuos de la misma especie. En carneros, se ha establecido que la lana y la suarda de la misma, tienen un importante papel como fuente de estas señales. En este sentido se ha demostrado que las ovejas con lana de varios meses tienen una mayor atractividad comparado a ovejas recién esquiladas (Tilbrook y Cameron, 1989). Los altos niveles de acumulación de las señales químicas en vellones largos probablemente esté relacionada con una mayor atractividad (Ungerfeld, 2002). Asimismo también se sugiere una mayor atractividad por parte de ovejas adultas frente a ovejas jóvenes (Ungerfeld, 2002).

En ovejas, el mucus vaginal y la orina han sido reportados como una fuente importante de señales químicas (Blissitt et al., 1990; Vázquez & Orihuela, 2001; Ungerfeld y Silva, 2005). El medio vaginal podría regular o influir en las características de las sustancias secretadas en el mismo y en la tasa de liberación de las mismas. En ratas, Merx et al. (1988) observaron que los machos prefieren hembras en celo con la flora vaginal intacta que aquellas que recibieron un tratamiento antibiótico local que elimina dicha flora. Trabajos posteriores en ovinos demostraron que la alteración de la flora vaginal normal mediante tratamientos locales con antibióticos también afecta la atractividad. Ungerfeld y Silva (2005) compararon la atractividad sexual de ovejas en celo con flora vaginal normal o tras una drástica disminución de la misma por tratamientos locales con antibióticos, y reportaron que los carneros seleccionan preferentemente a las primeras. Esto puede ser por un efecto directo de la flora vaginal, o del rol de la misma en la regulación del medio vaginal normal (Ungerfeld y Silva, 2005). De acuerdo a nuestro conocimiento no existe más información publicada sobre la relación entre la flora vaginal y la atractividad, u otros aspectos del comportamiento sexual en la oveja.

1.3. Sincronización de estro

Ya en el año 1948 Dutt y Casida demostraron que administraciones intramusculares diarias de 10 mg de progesterona bloquean la ovulación y la manifestación de celo en las ovejas (citado por: Robinson, 1967). La ovulación, comúnmente acompañada de celo, se presenta

entre 2 y 4 días luego de finalizado el tratamiento. Posteriormente Wintenberger (1952) reportó que si el tratamiento de progesterona se acompaña por una administración de gonadotrofina induce la ovulación en hembras en anestro, presentando además comportamiento de celo. Si no se realiza el mencionado pre-tratamiento con progesterona, se produce la ovulación pero sin manifestación de celo (Robinson, 1967). Por tanto, se establece como premisa que el celo se presenta solo después de un periodo de influencia de progesterona y únicamente cuando la concentración de la misma disminuyó a concentraciones basales (Robinson, 1967). De igual forma se observó que las formulaciones de progesterona de larga acción inyectables son muy efectivas en bloquear la manifestación de celo, pero afectan negativamente la fertilidad (Robinson, 1967). En síntesis, para que las sustancias con efecto similar a la progesterona sean efectivas, deben ser potentes, de acción corta, con una completa y rápida eliminación del organismo. Por lo tanto las formas de larga acción de progesterona tienen poco valor de uso (tomando como referencia la vida media de progesterona = 4 h).

En función de los avances que se habían registrado en lo referido a la fisiología del ciclo estral, se buscó desarrollar técnicas efectivas de sincronización del ciclo estral utilizando un “cuerpo lúteo artificial”, que pueda ser activado y suprimido de acuerdo a la necesidad. Es por ello que se comenzó a trabajar con esponjas de poliuretano impregnadas con progesterona, progestágenos o análogos activos, tanto en forma de aplicación subcutánea como en forma de dispositivos intravaginales. Estas nuevas formas de administración de progesterona demostraron ser muy efectivas en bloquear el estro y en sincronizar la ovulación. Luego de retirar los dispositivos se liberan los mecanismos fisiológicos que estaban frenados (Robinson, 1967). La duración de los tratamientos utilizados tradicionalmente es de 12 – 13 días simulando una fase luteal, buscando reproducir o imitar la endocrinología del ciclo estral. Es por ello que se combina la acción de progesterona (fase luteal artificial) y el uso de gonadotrofinas (Ungerfeld, 2002).

Existen diferentes hormonas que se utilizan en los tratamientos de sincronización e inducción de celos:

Progestinas:

Progesterona: que es igual a la que produce el animal en forma endógena. Su vida media en sangre es corta en el orden de pocos minutos y se metaboliza rápidamente (4 h). Puede ser inyectada, o administrada a través de implantes subcutáneos o dispositivos de liberación lenta intravaginal (Scott-Moncrieff et al., 1990).

Acetato de medroxiprogesterona (MAP): es un progestágeno sintético, que se utiliza comúnmente impregnado en esponjas intravaginales. Se sugiere que su

potencia es 10 a 20 veces mayor que la de la progesterona, y su vida media es bastante más prolongada (24-30 h) (Ungerfeld, 2001).

Acetato de fluorogestona (FGA): es también un progestágeno potente, y que permanece más tiempo en sangre que la MAP (Ungerfeld, 2001).

Dentro de las gonadotropinas, la gonadotropina coriónica equina (eCG) es la más utilizada. En la oveja posee tanto efecto FSH como LH (Ungerfeld, 2001).

1.3.1. Acetato de Medroxiprogesterona

El MAP, que químicamente corresponde a la methylacetoxyprogesterona, también conocido como metilpregnone, es un polvo cristalino blanco, prácticamente insoluble en agua, muy soluble en solventes orgánicos como el cloruro de metileno, acetona ó etanol (British Pharmacopoeia, 2007). La solución en dioxano tiene una presentación dextrógiro (Moffat et al., 1986). Su determinación analítica se realiza por espectrofotometría ultravioleta a 241 nm de longitud de onda en etanol absoluto (Moffat et al., 1986). Asimismo se puede cuantificar esta molécula en fluidos corporales y plasma a través de cromatografía de gas, espectrometría de masa y cromatografía líquida de alta presión (Moffat et al., 1986).

1.3.2. Regulación esteroidea de la flora vaginal

En ratas, tanto los estrógenos endógenos como los administrados por vía exógena tienen un papel preponderante en la dinámica de la flora vaginal (Larsen, 1977). En estos roedores ovariectomizados se ha constatado que la progesterona administrada conjuntamente con 17β -estradiol limita el aumento de la flora bacteriana, a diferencia de cuando se administra solamente el estradiol. La administración de progesterona sola por su parte, no afecta el conteo de la flora. Ratas ovariectomizadas sin tratamiento alguno muestran una estabilidad en su flora bacteriana vaginal, que suele estar presente en baja cantidad a lo largo del tiempo (Larsen, 1977).

Singh et al. (1996) demostraron que la variación normal que presentan las ratas en su flora bacteriana a lo largo del ciclo estral no se presenta en hembras con ovarios poliquísticos y estro permanente, animales que están en predominio estrogénico prolongado. La administración de gonadotropina coriónica humana (hCG) indujo la ovulación con el descenso de las concentraciones de estrógeno y aumento de las de progesterona en sangre. Esto además incidió en la afluencia de leucocitos en la vagina y una significativa disminución de la relación bacterias anaerobias/bacterias aerobias en la flora. Otros autores han determinado que la progesterona tiene un efecto inmunodepresor en bovinos, ovinos y suinos, lo que podría explicar parcialmente el aumento de la cantidad de bacterias en la flora vaginal en hembras tratadas con esta hormona (Lewis, 2003).

1.3.3. Problemas asociados al uso de implantes intravaginales

La utilización de dispositivos intravaginales para la inducción de celo en ovejas trae aparejado la ocurrencia de vaginitis, con corrimientos purulentos y hemorrágicos (Scudamore, 1988; Suárez et al., 2006; Manes et al., 2010). En ovinos se ha observado un importante aumento cualitativo y cuantitativo en la flora vaginal en el momento de retiro del dispositivo (Ahern, 1976; Moorthy & Singh, 1982; Amin, 1996; Suárez et al., 2006; Manes et al., 2010). Sin embargo a partir del momento del retiro de los dispositivos se ha observado un descenso drástico de la cantidad, retornando al día del estro a niveles similares a los observados antes de la introducción de la esponja, y similares a los observados en estros naturales (Suárez et al., 2006; Ysilmen et al., 2008; Manes, 2010). La presencia de un fluido vaginal anormal se ha correlacionado con el aumento de la incidencia de óvulos no fertilizados en ovejas superovuladas, con problemas en el desarrollo de los embriones y bajas tasas de preñez en embriones trasplantados (Scudamore, 1988). Aunque la información sobre la generación de la vaginitis en la bibliografía internacional es escasa, recientemente Yasilmen et al. (2008) han confirmado los resultados obtenidos por los anteriores investigadores referido al aumento cualitativo y cuantitativo de la flora vaginal, y al retorno de la misma a valores similares a los normales el día del estro (Suárez et al., 2006; Manes et al., 2010).

Por otro lado, otros autores descartaron que la presencia de la esponja en si misma cause problemas reproductivos, como ser la integridad de los espermatozoides (Hawk, 1972). Se ha observado que el uso de esponjas con MAP aumenta el porcentaje de espermatozoides rotos, aunque de acuerdo a Manes et al. (2010) este efecto no parece estar ligado a la presencia de la esponja en si misma. Estas respuestas en el tracto vaginal no son tan intensas cuando se utilizan dispositivos siliconados que no absorben el flujo secretado (Ungerfeld, 2001; observaciones no publicadas), aunque otros investigadores reportaron que la respuesta local fue indistinta de la composición del dispositivo intravaginal (Manes et al., 2010).

Dado que la progesterona tiene un efecto inmunodepresor (Lewis, 2003; Sheldom et al., 2006), la vaginitis generada podría contribuir a la evolución de la contaminación de útero o vagina, y a infecciones propiamente dichas (Lewis, 2003; Sheldom et al., 2006). Por tanto la vaginitis generada podría ser consecuencia de la esponja en sí misma como cuerpo extraño dentro de la vagina, con su consecuente absorción y retención de fluido, sumado al efecto local de inmunosupresión de la hormona en si misma. Los cambios en la flora vaginal podrían estar o no vinculados con variaciones en el número de bacterias patógenas, pero dado que los mismos afectan el medio vaginal y su flora normal, esto podría afectar el resultado reproductivo [ratas: Merx (1988); ovinos: Ungerfeld & Silva (2005)].

1.3.4. Vaginitis

Suárez et al. (2006) determinaron que la presencia de esponjas en la vagina genera una reacción inflamatoria que aumenta la secreción local de mucus, con el concomitante aumento de la flora bacteriana. A su vez, reportaron que ya desde el día 5 luego de la introducción de las esponjas se registra el máximo volumen del flujo vaginal y la mayor cantidad en los recuentos bacterianos. Además se estableció que este hecho sucedía tanto en tratamientos cortos o largos (5, 9, y 13 días). No obstante, también se observó que existe una disminución drástica de los conteos bacterianos a partir del momento del retiro de los dispositivos vaginales, llegando a niveles normales al momento del celo. Estos niveles son similares a los obtenidos en controles previos a la introducción de las esponjas, e igualmente similares a las hembras en celo sin tratamiento. Estos investigadores, coincidiendo con lo reportado por Ahern (1976) en ovinos y Singh et al. (1996) en ratas, encontraron que existe una gran afluencia de leucocitos polimorfonucleares a la vagina. Incluso se reconoció la presencia de fagocitos ingiriendo espermatozoides, lo que potencialmente podría afectar la fertilidad en sincronizaciones realizadas con esponjas intravaginales.

Algunos autores han descrito la composición de especies de la flora vaginal normal y los cambios cualitativos en la flora vaginal después de utilizar dispositivos intravaginales de liberación de hormona como las esponjas (Moorthy & Singh, 1982; Martins et al., 2009; Martins et al., 2010; Manes et al., 2010), incluso existen reportes de vaginitis en humanos por la utilización de OB® (Martins, 2010). Todos estos autores coinciden en que las bacterias coliformes son las más prevalentes como resultado del gran crecimiento bacteriano en la vagina. Las cepas aisladas con mayor frecuencia fueron Gram negativas, y correspondieron a *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. En humanos algunos autores han reportado que los lipopolisacáridos de las bacterias Gram negativas son promotores de infertilidad y pérdidas de gestación a través de un desarrollo anormal del embrión y fallas en la implantación. Los mismos afirman que una vez que estos mediadores de la inflamación aumentan en el tejido materno son muy perjudiciales para el desarrollo normal de la gestación (Dub et al., 2004a y b).

Por otra parte, es de interés controlar el aumento de la carga bacteriana vaginal mediante la utilización de un antibiótico de amplio espectro, aunque existen muy pocos antecedentes específicos (Suárez et al. 2006; Yasilmen et al., 2008; Martins et al. 2009). De acuerdo a los antibiogramas realizados por Suárez et al. (2006), la administración de oxitetraciclina es una opción que podría, potencialmente, controlar o disminuir las vaginitis generadas por las esponjas. Por su parte Martins et al. (2009) incluyen a la ciprofloxacina y a trimetoprim-sulfametazole como antibióticos efectivos en el control de la vaginitis provocada por el uso de esponjas intravaginales.

De acuerdo a la bibliografía que se refiere a la antibiótico terapia en infecciones del aparato reproductor de hembras bovinas (Gustafsson, 1989), para que un tratamiento sea efectivo es

esencial que una cantidad importante de la droga alcance y se mantenga en el sitio de la infección durante un lapso adecuado. En bovinos, las patologías inflamatorias-infecciosas como la vaginitis resultan en una menor capacidad de absorción del epitelio mucoso. Una mala absorción da lugar a altas concentraciones de antibiótico en la cavidad del órgano, pero no se logran buenas concentraciones en los tejidos de la submucosa (Gustafsson, 1989). Por otra parte, una infección moderada o severa del aparato reproductor distal raramente está localizada solo en la capa superior del epitelio vaginal y por lo tanto se debería considerar como estrategia terapéutica el tratamiento sistémico. Sin embargo, antibióticos en crema o gel en forma intravaginal local son los tratamientos preferidos para las vaginitis en humanos por su efectividad (Joesoef, 1999; Shalev, 2002).

2. Hipótesis

1- Primera hipótesis: *la esponja en sí misma como dispositivo genera el mayor efecto relativo del aumento de la carga bacteriana.*

2- Segunda hipótesis: *los tratamientos con antibióticos permiten controlar o disminuir el aumento de la carga bacteriana generados por el uso de esponjas intravaginales.*

3- Tercera hipótesis: *los celos sincronizados con tratamientos con esponjas tienen menor atraktividad que los celos que se presentan espontáneamente.*

4- Cuarta hipótesis: *el uso de antibiótico terapia asociada a los dispositivos intravaginales afecta la disminución de atraktividad de los celos sincronizados.*

3. Objetivos Generales

Determinar los efectos del uso de dispositivos intravaginales de sincronización de celo (esponja) sobre la flora bacteriana vaginal en ovinos y desarrollar posibles alternativas para el control de dichas alteraciones.

Determinar las posibles alteraciones del comportamiento sexual causadas por el uso de esponjas intravaginales en ovejas.

3.2. Objetivos Específicos

Determinar si la carga bacteriana vaginal generada por el uso de esponjas intravaginales que contienen MAP en ovejas es mayor que aquella generada en animales en que se utilizan esponjas placebo.

Determinar las cargas bacterianas generadas por el uso de esponjas intravaginales conteniendo MAP con o sin adición de oxitetraciclina, ya sea por vía parenteral o local.

El objetivo del Experimento 3 fue determinar si el uso de esponjas intravaginales conteniendo MAP disminuye la atraktividad de las ovejas en celo.

Una vez determinada la disminución de la atraktividad, en el Experimento 4 se planteó como objetivo determinar si la disminución de la atraktividad puede ser parcialmente afectada por la implementación de un tratamiento local con oxitetraciclina.

4. Experimentos 1 y 2

4.1. Introducción

Esponjas intravaginales impregnadas con progestágenos han sido usualmente utilizadas para la sincronización de estros en ovejas y cabras. Sin embargo al retiro de los dispositivos intravaginales existe en algunos casos una descarga hemorrágica, pútrida y purulenta (Scudamore, 1988; Amin, 1996; Suárez et al., 2006). La vaginitis causada por la esponja actuando como cuerpo extraño en vagina ha sido reportada por varios investigadores (Scudamore, 1988; Suárez et al. 2006); asimismo existen antecedentes de un efecto inmunodepresor de la progesterona en bovinos, el que podría contribuir a la vaginitis e incremento de la flora vaginal (Sheldom et al., 2006). De acuerdo con nuestro conocimiento no se ha estudiado la contribución de la esponja y del contenido hormonal en sí mismo, en la generación de la vaginitis.

Algunos laboratorios productores de esponjas, recomiendan la utilización de antibióticos de amplio espectro para reducir las vaginitis. Estudios comparativos de diferentes antibióticos in vitro determinaron que la oxitetraciclina tiene una gran efectividad en los antibiogramas realizados y sería un antibiótico de elección para el control de las vaginitis (Suárez et al., 2006). Existen por otro lado estudios que determinan la importancia de la concentración de antibiótico en el tracto reproductivo y la duración de esta concentración para controlar las infecciones, que cuestionan las diferentes vías de administración de dicho antibiótico dado que el epitelio local vería afectada su capacidad de absorción (Gustafsson, 1989).

4.2. Objetivos Específicos

Determinar si la carga bacteriana vaginal generada por el uso de esponjas intravaginales que contienen MAP en ovejas es mayor que aquella generada en animales que utilizan esponjas placebo.

Determinar las cargas bacterianas generadas por el uso de esponjas intravaginales conteniendo MAP con o sin adición de oxitetraciclina, ya sea por vía parenteral o local.

4.3. Materiales y Métodos

4.3.1. Animales y metodología

Se realizaron 2 experimentos en el Campo Experimental N° 1 Migues, Canelones (34°22'S, 55°36'O). Los trabajos de laboratorio se realizaron en el Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. En ambos experimentos se utilizaron ovejas nulíparas Corriedale X Milchschaaff (37,9 ± 0,7 kg, media ± EE). Durante el periodo experimental los animales se mantuvieron pastando sobre campo natural. Ambos experimentos se realizaron durante el anestro estacional, entre octubre y noviembre para evitar la influencia del momento del ciclo estral sobre la flora vaginal.

4.3.2. Experimento 1

Se utilizaron dos grupos de ovejas a las que se les colocó esponjas intravaginales con MAP (n=11; 50 mg AP, Sincrovin, Lab. Santa Elena, Montevideo, Uruguay) o sin MAP (n=10), por un periodo de 14 días. Se tomaron muestras de mucus vaginal en el momento de la colocación y del retiro de las esponjas, y durante los 3 días siguientes.

Las esponjas placebo fueron los mismos dispositivos comerciales a los que se eliminó el MAP utilizando etanol (95°). El mismo se colocó en un embudo y con la ayuda de una varilla de vidrio se lavó cada esponja con 95 mL de etanol absoluto, y se secaron en estufa por 4 h. Para la verificación de que la esponja comercial finalizaba el proceso libre de MAP se realizó una segunda ronda de lavados y determinaciones analíticas, poniendo nuevamente cada esponja en un embudo y realizando el lavado anteriormente descrito. La muestra obtenida como resultado del lavado se enrazó con 100 mL de etanol absoluto y se tomó una muestra de 1 mL. En 20 esponjas se determinó la cantidad de MAP luego de los lavados, para las esponjas del experimento y contra-contrroles ciegos. Esta muestra se diluyó en una relación 1/50 con etanol puro. La cuantificación se realizó por la determinación de la absorbancia a 241 nm de la solución control. Las muestras libres de MAP no presentaron ni picos ni valles comparado con los estándares de absorbancia de la droga, y lo único que se graficó fueron impurezas. En tanto las esponjas que contenían MAP presentaron un patrón de picos de absorbancia media de 0,931 A. Realizando el cálculo de concentración en mg/ml y utilizando la absorbancia estandar del MAP $A_1^1 = 426$ A se determinó una concentración media de las esponjas de 54,6 mg.

4.3.3. Experimento 2

Se utilizaron tres grupos de 12 ovejas a las que se les colocó esponjas comerciales con MAP por un periodo de 14 días. Mientras que las ovejas de uno de los grupos no recibieron ningún otro tratamiento, los animales de los otros dos recibieron tratamiento con oxitetraciclina al 20% (Oxilen, Lab. Vetanco, Buenos Aires, Argentina) por vía parenteral

(20 mg/kg) o local (0,02 mg en 0,1 mL inyectado en cada esponja). Al momento del retiro de las esponjas todas las ovejas recibieron 300 UI eCG im (Novormón, Syntex, Buenos Aires, Argentina). Se obtuvieron muestras de mucus vaginal los días de la colocación y retiro de las esponjas, y diariamente hasta el celo o hasta 3 días luego del retiro. El celo se determinó dos veces por día con la utilización de carneros por un lapso de 60 minutos cada vez, a los que no se les permitió la monta completa evitando penetración o eyaculación.

4.3.4. Colección de las muestras y determinación bacteriológica

Las muestras de mucus vaginal se colectaron directamente de la vagina utilizando hisopos estériles, por contacto directo durante 3 segundos, sin tocar las paredes vaginales. Para realizar el recuento total de la flora vaginal, los hisopos fueron agitados en vortex a velocidad máxima en 1 mL de solución tampón salino fosfatada (PBS) estéril, pH 7,4 por un minuto con el fin de suspender las bacterias. La suspensión bacteriana resultante fue diluida en forma seriada, sembrada en agar sangre e incubada por 48 h a 37°C para luego determinar la cantidad de Unidades Formadoras de Colonias por mL (UFC/mL).

4.3.5. Análisis estadístico

La cantidad de UFC/mL fue comparada por ANOVA para mediciones repetidas, luego de una transformación logarítmica para normalizar la distribución de los datos. El modelo incluyó los efectos fijos del tratamiento y el tiempo, así como la interacción entre ellos.

4.4. Resultados

La cantidad de bacterias cambió a lo largo del tiempo ($P < 0,0001$), aunque no resultó afectado por el hecho de que la esponja tuviera o no MAP ($P = 0,7$) (Figura 4). La cantidad de UFC/mL fue significativamente mayor en el día del retiro (día 14) que en el día En los días 16 y 17 (2 y 3 días desde el retiro respectivamente), las UFC/mL fueron similares a las vistas en el día 0 (previo a la colocación del dispositivo vaginal).

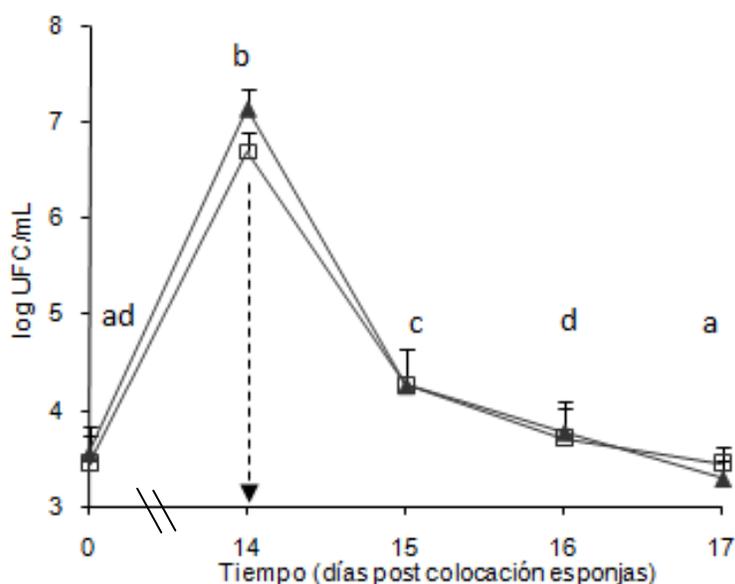


Figura 4. Evolución de la flora vaginal expresado en log Unidades Formadoras de Colonias/mL (UFC/mL). Grupo de ovejas tratamiento esponjas con MAP (\square), o esponjas sin MAP (\blacktriangle). No existió diferencia significativa entre grupos. Letras diferentes muestran diferencia significativa en el tiempo: $P < 0,0001$. Día 0 = colocación de las esponjas; Día 14 (flecha) = retiro de las esponjas.

En el segundo experimento las UFC/mL fueron afectadas por el tiempo ($P < 0,0001$), el tratamiento ($P < 0,004$), y existió una interacción entre el tratamiento y el tiempo ($P < 0,0001$). La flora vaginal fue significativamente mayor al día 14 (retiro) comparadas en los días 0 y 15 ($P < 0,0001$) en todos los grupos y descendió al día siguiente, siendo a las 48 h y 72 h similar a los valores observados antes de la introducción de las esponjas ($P < 0,0001$) (Figura 5). Se observó una menor cantidad de UFC/mL al momento del retiro

de las esponjas en ovejas tratadas con antibióticos ($P < 0,0001$). Asimismo, el valor total de UFC/mL fue menor en el grupo con tratamiento local de antibiótico, que con tratamiento sistémico ($P < 0,0001$). La flora vaginal expresada en UFC/mL al momento del celo fue similar para todos los tratamientos, e incluso fue similar a aquellos valores observados previos a la introducción de las esponjas.

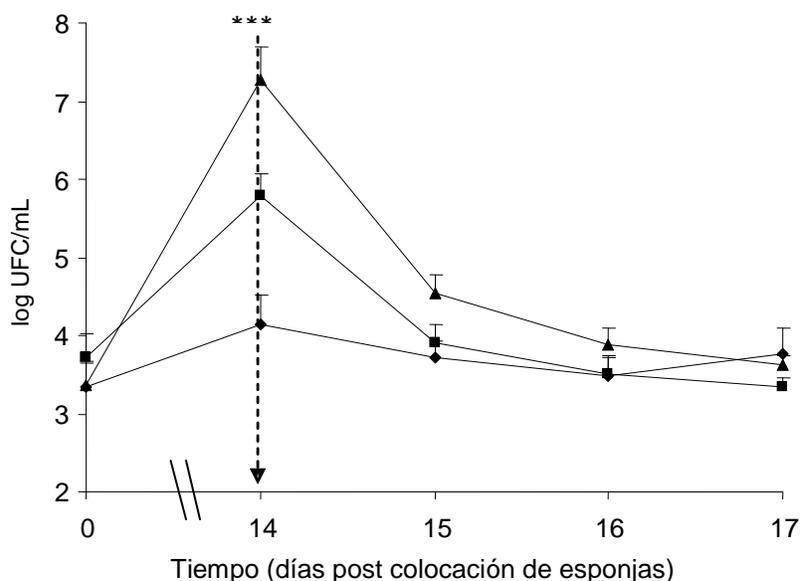


Figura 5. Evolución de la flora vaginal expresado en log Unidades Formadoras de Colonias/mL (UFC/mL). Ovejas tratadas con esponjas, con oxitetraciclina administrada por vía sistémica (■), local (◆), y sin antibiótico (▲). (***) Diferencia entre tratamientos: $P < 0,0001$. Día 0 = introducción de las esponjas; Día 14 (flecha)= retiro de las esponjas.

4.5. Discusión

Se demostró que no hubo diferencias sobre el número de bacterias vaginales totales aerobias cultivables (UFC) con esponjas con o sin MAP en ovejas en anestro. Esto puede implicar que la presencia de la esponja como cuerpo extraño en vagina causa por sí mismo el mayor efecto en el aumento de la flora vaginal, o que este aumento no se afecta por la presencia de MAP en la esponja. Es posible especular tanto que cuando el MAP es administrado en forma local por las paredes vaginales tal vez no contribuye al aumento de la carga bacteriana; o que la esponja en sí misma, con una absorción y retención constante de las secreciones vaginales sea el causante del mayor crecimiento de la flora vaginal. De todas formas quedaría por determinar si el MAP en si mismo afecta la respuesta inmune en una administración local, como ocurre con otras progestinas (Lewis, 2003).

Ambos tratamientos con antibióticos controlaron parcialmente el aumento de flora provocado por el uso de esponjas. Por tanto es posible sostener que el tratamiento *in vivo* con oxitetraciclina fue efectivo en disminuir el crecimiento bacteriano provocado por el uso de las esponjas, la administración local retardó y controló el crecimiento bacteriano de mejor forma que el tratamiento sistémico.

En ambos experimentos, las UFC/mL de todos los grupos regresaron a valores iniciales luego de 24-48 h desde el retiro de las esponjas. Es factible que exista una respuesta inmune local o mecanismos de defensa no específicos, como movimientos/tránsito vaginal, o descamación celular, que podría ser la responsable del decrecimiento de la flora bacteriana después del retiro de las esponjas o hasta el celo. Suárez et al. (2006) observaron la presencia de un importante número de macrófagos luego del retiro de las esponjas, reflejando una posible respuesta inmune a nivel local. De igual forma, como el número de UFC/mL desciende después que la concentración de progesterona desciende, la regulación hormonal del estro puede estar jugando algún papel en el control natural de la vaginitis inducida por el tratamiento con esponjas.

Finalmente, se concluyó que el contenido de MAP no contribuyó al aumento de la carga bacteriana provocada por el tratamiento con esponjas y que el tratamiento local con antibiótico fue más efectivo que el tratamiento sistémico para controlar el aumento de la flora vaginal provocada por la introducción de las esponjas.

5. Experimentos 3 y 4

5.1. Introducción

Existen señales químicas que son liberadas al ambiente por parte de un individuo, que generan una reacción y estimulan cambios fisiológicos de otros individuos de la misma especie. En carneros, se ha establecido que la lana y la suarda de la misma, tienen un importante papel como fuente de señales químicas (Tilbrook & Cameron 1989).

La atractividad es uno de los componentes del comportamiento de celo, y se considera como los factores que hacen diferente una hembra de otra, generando mayor o menor atracción hacia los machos (Banks, 1964). En ovejas, el mucus vaginal y la orina han sido reportados como una probable fuente de señales químicas (Blissitt et al., 1990; Vázquez & Orihuela, 2001; Ungerfeld y Silva, 2005). Además, es posible que el medio vaginal influya en las características de estas señales químicas y/o la tasa de liberación de las mismas (Ungerfeld y Silva, 2005). Trabajos posteriores demostraron que en ovinos la alteración de la flora vaginal normal mediante tratamientos locales con antibióticos provoca una disminución de la atractividad sexual. En este sentido, Ungerfeld y Silva (2005) compararon la atractividad sexual de ovejas en celo con flora vaginal normal o tras una drástica disminución de la misma por tratamientos locales con antibióticos, reportando que este tratamiento hace disminuir la atractividad marcadamente.

Por otra parte, Suárez et al. (2006), y en los Experimentos 1 y 2 de la presente tesis se determinó que la presencia de esponjas en la vagina genera un aumento en la carga bacteriana que se asocia con un marcado aumento de la carga bacteriana. Asimismo se ha propuesto la utilización de antibióticos locales como método de control del gran aumento en el número de bacterias en sincronizaciones de celos con esponjas intravaginales (Suárez et al. 2006; Yasilmen et al., 2008; Martins et al. 2009). En este sentido, en el Experimento 2 se demostró que la administración local de oxitetraciclina fue el manejo más efectivo de los ensayados para controlar mejor el aumento de flora vaginal provocada por el uso de las esponjas.

5.2. Objetivos Específicos

El objetivo del Experimento 3 fue determinar si el uso de esponjas intravaginales conteniendo MAP disminuye la atraktividad de las ovejas en celo.

Una vez determinada la disminución de la atraktividad, en el Experimento 4 se planteó como objetivo determinar si la disminución de la atraktividad puede ser afectada por la implementación de un tratamiento local con oxitetraciclina.

5.3. Materiales y Métodos

5.3.1. Animales y metodología

Se realizaron 2 experimentos, en ambos se utilizaron ovejas multíparas Corriedale, Milchscaff y sus cruzas ($36,9 \pm 0,5$ kg). Durante el periodo experimental, estación reproductiva (febrero) los animales se mantuvieron pastando sobre campo natural.

5.3.2. Experimento 3

Se utilizaron dos grupos de 36 ovejas adjudicadas a dos grupos experimentales. Mientras que las ovejas de uno de los grupos manifestaron el estro en forma espontánea ($n=18$), las restantes manifestaron el celo tras un tratamiento por 14 días con esponjas intravaginales comerciales (50 mg MAP, Sincrovin, Santa Elena, Montevideo, Uruguay).

Se comparó la atraktividad en ovejas con estro comprobado realizando 12 tests con 6 hembras con estro comprobado cada uno (3 de cada grupo) mediante el test de Tilbrook & Lindsay (1987). El día del celo se tomaron muestras de mucus vaginal por contacto con un hisopo estéril a aproximadamente 2 cm de los labios vulvares. Las muestras fueron procesadas igual que en los experimentos anteriores.

5.3.3. Experimento 4

Se ranqueó de la misma forma que en el experimento anterior a 12 repeticiones con 6 ovejas con celos sincronizados con esponjas en estro comprobado. En cada grupo, 3 ovejas fueron tratadas solamente con esponjas con MAP y las otras 3 con esponjas con MAP y el mismo tratamiento con antibiótico local utilizado en el Experimento 2 (0,02 mg de oxitetraciclina al 20% por vía local inyectada en 0,1 mL) por 14 días. Se tomaron muestras de flora vaginal, las que fueron procesadas igual que en los experimentos anteriores.

5.3.4. Test de atraktividad

Para determinar la atraktividad de las ovejas se utilizó el test descrito por Tilbrook & Lindsay (1987). En dicho test no interfiere la proceptividad y por lo tanto es una evaluación únicamente de la atraktividad. En cada test las ovejas fueron colocadas sueltas en un corral de 5x5 m con un carnero, y durante 5 min se registró el tiempo que el carnero cortejó a cada hembra. Una vez determinada la más cortejada la misma fue retirada (hembra más atraktivada). El procedimiento se repitió hasta que el carnero ranqueó a las seis hembras. Si en 5 minutos no se estableció la hembra de mayor atraktividad se continuó durante 15 minutos. El test se repitió con doce carneros que ranquearon a 12 grupos de ovejas, siendo utilizadas en cada caso 3 ovejas de cada grupo experimental.

5.3.5. Análisis estadístico

La cantidad de UFC/mL fue normalizada (transformación logarítmica) y comparada por ANOVA. Los rangos de atractividad fueron comparados con el test de Friedman.

5.4. Resultados

5.4.1. Experimento 3

La cantidad de UFC/mL fue significativamente mayor en las ovejas en que se usaron esponjas que en las que no se usaron y presentaron celo espontáneo [(150,6 ± 74,8) X 10³ vs (9,2 ± 4,7) X 10³ UFC/mL respectivamente, P=0,03]. Las hembras con celo espontáneo fueron más atractivas que las hembras que habían usado esponja vaginal (2,9 ± 0,3 vs 4,1 ± 0,3 media de posición por atractividad respectivamente) (P<0,002). La cantidad de animales de cada grupo en cada posición es presentada en la Tabla 1.

Tabla 1. Posiciones por atractividad asignadas por Test de Tilbrook & Lindsay (1987) entre grupos de ovejas cuyos estros fueron sincronizados o espontáneos.

Posición	Celos espontáneos	Tratamiento con esponjas
1	9	3
2	8	4
3	8	4
4	5	7
5	2	10
6	4	8

5.4.2. Experimento 4

No existieron diferencias significativas en la atractividad de ovejas con esponjas con MAP y MAP con antibiótico (3,5 ± 0,3 vs 3,4 ± 0,3 media de posición por atractividad respectivamente). La cantidad de ovejas en cada posición es presentada en la Tabla 2. La cantidad de UFC/mL fue significativamente mayor en el grupo que se utilizó únicamente esponjas intravaginales que en las que se les trató conjuntamente con antibiótico local [(4,7 ± 0,6) X 10³ vs (3,7 ± 0,4) X 10³ UFC/mL respectivamente P<0,001].

Tabla 2. Posiciones por atraktividad asignadas por Test de Tilbrook & Lindsay (1987) entre grupos de ovejas cuyos estros fueron sincronizados con esponjas (MAP) con o sin oxitetraciclina local.

Posición	Esponja sin Antibiótico	Esponja con Antibiótico
1	7	5
2	7	5
3	3	10
4	5	7
5	9	4
6	5	5

5.5. Discusión

El uso de esponjas intravaginales disminuyó la atractividad de las hembras en celo. Esto podría estar vinculado al aumento de la cantidad de UFC vaginales observado el día del celo tras el uso de esponjas intravaginales. Si bien el diseño experimental no permite determinar qué tipo de alteración afectó las señales químicas, sí se puede inferir que las mismas se vieron afectadas, o que su participación como componente de la atractividad varió significativamente. Igualmente, se demostró que otras señales vinculadas a la atractividad de la oveja, no fueron suficientes para revertir el efecto negativo de estos cambios. La variación de la flora vaginal y por tanto de las señales liberadas a través del mucus vaginal es de tal magnitud que no se revierte por las demás vías de comunicación, o que las mismas no son tan importantes como las señales químicas liberadas a través de la vagina en la oveja. Dado que las concentraciones de estrógenos son similares en ovejas con celos espontáneos y con celos sincronizados con esponjas con MAP (Letelier, 2008) puede descartarse que la concentración de esta hormona fuera la que generara la diferencia observada.

Existió un efecto por la presencia de la esponja como cuerpo extraño y a pesar de que el tratamiento con el antibiótico determinó una disminución del crecimiento bacteriano, probablemente los cambios en la ecología vaginal (Martins, 2009; Manes 2010), lo hicieron menos atractivo. Posiblemente el efecto de la esponja como generadora de cambios en la ecología de la flora vaginal no se revierte por el control del tratamiento local con antibióticos, aunque si se ve reflejado en la disminución de la cantidad de UFC. La determinación cualitativa de la variación en la flora vaginal y la manipulación de la flora alterada podría explicar algunos de los aspectos de la menor atractividad. Por otro lado, el efecto del antibiótico sobre la flora vaginal, podría alterar la atractividad, dado que únicamente tiene efecto sobre el aumento de UFC de los géneros bacterianos sensibles al antibiótico, causando un sesgo de la flora remanente. Asimismo la presencia del antibiótico podría influir sobre la menor atractividad dado que de acuerdo con Manes (2010) y Martins (2010), se altera la ecología bacteriana vaginal, generando un efecto similar al que tiene la presencia del corrimiento purulento consecuencia de la vaginitis.

Por lo tanto, se concluyó que las ovejas con celos espontáneos fueron más atractivas que hembras que se les sincronizó el celo con esponjas intravaginales, y que no fue posible revertir la disminución de la atractividad a partir de la administración local de oxitetraciclina.

6. Discusión general

En todos los experimentos se repitió un patrón similar de evolución de la flora vaginal: un aumento significativo al momento de retirar los dispositivos y un marcado descenso al día siguiente del retiro de la esponja, el que llegó a valores similares a los establecidos previos a la introducción de estas el día del celo. Aunque queda demostrado que los estrógenos o la presencia del estro no es el factor de mayor determinación en el descenso de las UFC, dado que la disminución se similar en esponjas sin MAP o con MAP y tratamiento con eCG; los mecanismos que no dependen de los estrógenos son los suficientemente determinantes para restablecer los valores de las UFC más allá de la presencia o no de dichas hormonas. La marcada caída de los conteos bacterianos 24-48 h luego de retiradas las esponjas se podría explicar por una regulación hormonal que acompaña el momento del estro (Larsen et al., 1977; Singht et al., 1996), dado que la reducción en UFC se estableció después que la concentración de la progestina debió estar baja. Esto podría determinar algún tipo de regulación endócrina natural a la vaginitis inducida por la esponja. También podría deberse a la reanudación del “clearance” vaginal que se veía interferido por la presencia de la esponja en vagina. Asimismo, existen registros de una gran presencia de células de la línea blanca (Suárez et al. 2006) en los tejidos de la vagina, lo que indica que existió una respuesta inmune local que sería al menos parcialmente capaz de controlar la vaginitis desde el momento en que se introduce la esponja y luego de retirada la fuente causante de la misma.

En el primer experimento se determinó que el aumento del número de bacterias a lo largo del tiempo no es dependiente de la presencia o no de MAP en la esponja, y a que el contenido de MAP no modificó la variación en la cantidad de bacterias observada. Por tanto, dicho crecimiento posiblemente sea consecuencia de la esponja en sí misma, actuando como cuerpo extraño en la vagina, y de existir en este caso, el efecto inmunodepresor de los progestágenos pueda quedar “enmascarado” por el efecto máximo generado ya de por sí por la esponja. Probablemente la absorción y retención de fluidos vaginales en la esponja determine la vaginitis o interfiera con el “clearance” vaginal normal de estas secreciones, favoreciendo la multiplicación bacteriana. En el segundo experimento se presentó igual patrón en la dinámica bacteriana vaginal y se determinó que el crecimiento bacteriano fue menor en animales con tratamiento antibiótico local, aunque al momento del celo las cantidades eran similares independientemente del uso de antibiótico y de la vía de su administración. Se demostró que el tratamiento local con antibióticos limita el aumento en el conteo bacteriano que se observa al momento de retiro de las esponjas. Aunque ambos tratamientos con antibióticos tuvieron efecto sobre el crecimiento de la flora vaginal, el tratamiento sistémico no presentó igual efectividad, tal vez por no alcanzar una concentración óptima en la mucosa vaginal o por no mantener por un periodo de tiempo mínimo efectivo la concentración terapéutica de la droga en el órgano.

En el tercer experimento se determinó que las hembras con estros sincronizados con esponjas intravaginales son menos atractivas que las hembras que presentan celo natural. Esta menor atraktividad de las hembras con estro inducido no se pudo revertir con la utilización de antibioticoterapia local (Experimento 4), tratamiento que sí fue efectivo para controlar el aumento de la flora vaginal. Si bien es claro que el efecto del antibiótico redujo el crecimiento de flora vaginal al momento del retiro de las esponjas, existe de todas formas una alteración de la ecología vaginal que podría estar determinando una menor atraktividad hacia los machos. Esto podría deberse a una modificación de la flora, que no se revierte solamente a través del tratamiento con antibiótico. Por otra parte, el antibiótico local en si mismo puede estar alterando la atraktividad dado que también afecta en forma notoria la composición normal de la flora vaginal la que influye marcadamente en la atraktividad de la hembra.

7. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en la presente tesis se concluyó que:

- el contenido de MAP en las esponjas vaginales no contribuyó al aumento de la carga bacteriana provocada por el tratamiento con los dispositivos.
- el tratamiento con oxitetraciclina controló parcialmente el aumento de la flora vaginal generado por el uso de las esponjas.
- el tratamiento local con oxitetraciclina fue más efectivo que el tratamiento sistémico para controlar dicho aumento de la flora vaginal.
- las ovejas con celos espontáneos fueron más atractivas para los carneros que aquellas a las que se les sincronizó el celo con esponjas intravaginales.
- la administración de oxitetraciclina no afectó la disminución de la atraktividad generada por la esponja.

8. Bibliografía

Ahern, C.P., 1976. The bacteriology of vaginal mucus and intravaginal sponges from sheep and the effect of coating sponges with antibacterial agents. *Irish Vet. J.* 30, 111-117.

Amin, J.D., 1996. Effect of fluorogesterone acetate impregnated intravaginal sponges on vaginal flora of ewes. *Nigerian J. Anim. Prod.* 23, 98-100.

Arendt, J., 1986. Role of the pineal gland and the melatonin in seasonal reproductive function in mammals. *Oxford Rev. Reprod. Biol.* 8, 266-320.

Banks, E.M., 1964. Some aspects of sexual behaviour in domestic sheep, *Ovis aries*. *Behavior* 23, 249-279.

Beach, F.A., 1976. Sexual attractivity, proceptivity and receptivity. *Horm. Behav.* 7, 105-138.

Blissitt, J.M., Bland, K.P., Cottrell, D.F., 1990. Olfactory and vomeronasal chemoreception and the discrimination of oestrus and non oestrus ewe urine odours by the ram. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 27, 325-335.

Bonino, J., 2003. Cordero pesado carne ovina de calidad. www.vet-uy.com/articulos/artic_ov/002/ov002bas.htm. Accedido: 08/10/2010.

British Pharmacopoeia. 2007. The Stationery Office Copyright Inc. 2007. Vol. II, 1321-1323.

Bronson, F.H., 1988. Mammalian reproductive strategies: genes photoperiod and latitude. *Reprod. Nut. Dev.* 28, 335-347.

Cardellino, R., 2002. El total de lo exportado por Uruguay de lana y derivados fue de 180 millones de dólares, de setiembre 2001 al 31 de octubre 2002. www.uruguay2030.com/LaOnda/LaOnda/Entrevistas/Ing%20Roberto%20Cardellino.htm Accedido: 24/05/2007.

DICOSE, 2008. Existencias Totales Nacionales año 2008. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. <http://mgap.gub.uy/DGSG/DICOSE> Accedido: 22/8/2010.

Deb, K., Chaturudi, M.M., Jaiswal Y.K., 2004. Comprehending the role of LPS in Gram-negative bacterial vaginosis: ogling into the causes of unfulfilled child-wish. *Arch. Gynecol. Obstet.* 270, 133-146.

- Deb, K., Chatturudi, M.M., Jaiswal, Y.K., 2004. Gram-negative bacterial endotoxin-induced infertility: A birds eye view. *Gynecol. Obstet. Invest.* 57, 224-232.
- Forsberg, M., 2002. Estacionalidad reproductiva: el significado de la luz. En Ungerfeld, R. (Editor), *Reproducción en los animales domésticos. Tomo I.* Melibea, Montevideo, Uruguay. pp. 121-138.
- Goodman, R.L., Inskeep, E.K., 2006. Neuroendocrine control of the ovarian cycle of sheep. En Knobil E., Neills, J.D. (Editores), *Physiology of Reproduction 3rd Edition.* Academic Press-Elsevier. pp. 2389-2428.
- Gustafsson, B. K., 1989. Tendencias actuales en la terapia de las infecciones uterinas. XVII Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay. 16-18 Junio 1989. K1-K8.
- Hawk, H.W., 1972. Progestagen induced sperm breakage in the sheep vagina. *J. Anim. Sci.* 34, 795-798.
- Jainudeen, M.R., Hafez, E.S.E., 1992. Ciclos reproductivos: Ovejas y cabras. En Hafez E.S.E. (Editor), *Reproducción e inseminación artificial en animales. 5ª Edición Interamericana Mc Graw-Hill.* pp. 341-350.
- Joesoef, M.R., 1999. Bacterial vaginosis: review of treatment options and potential clinical indications for therapy. *Clin. Infect. Dis.* 28, (Suppl. 1) 557-565.
- Karsch, F.J., Malpaux, B., Wayne, N.L., Robinson, J.E., 1988. Characteristic of the melatonin signal that provide the photoperiodic code for timing seasonal reproduction in the ewe. *Reprod. Nutr. Dev.* 28, 459-472.
- Laguna, T., 2009. En el Uruguay progresista, ¿hay lugar para los ovinos? www.uruguayinforme.com/news/28082009/28082009_tomas_laguna.php Accedido: 27/7/2010.
- Larsen, B., Markovetz, A.J., Galask, R.P., 1977. Role of estrogen in controlling the genital microflora of female rats. *Appl. Environ. Microbiol.* 34, 534-540.
- Letelier C.A., 2008. Caracterización de la funcionalidad ovárica e hipofisaria producida por el tratamiento progestativo para la sincronización de celo en ovinos. Tesis Doctoral, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Lewis, G.S., 2003. Steroidal regulation of uterine resistance to bacterial infection in livestock. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1, 117-124.
- Malpaux, B., Karsch, F.J., 1990. A role for short days in sustaining seasonal reproductive activity in ewes. *J. Reprod. Fertil.* 90, 555-562.

Manes, J., Fiorentino, M.A., Kaise, G., Hazbor, F., Alberio, R., Sanchez, E., Paoliccini, F., 2010. Changes in the aerobic vaginal flora after treatment with different intravaginal device in ewes. *Small. Rum. Res.* En prensa.

Martins, G., Figueira, L., Penna, B., Brandao, F., Vargas, R., Vasconcelos, C., Lilenbaum, W., 2009. Prevalence and antimicrobial susceptibility of vaginal bacteria from ewes treated with progestin-impregnated intravaginal sponges. *Small Rumin. Res.* 81, 182-184.

Martins, L. T., dos Santos Neto, P. C.; Neto, S. G.; Pereira Rauber L.; Bertolini M.; Vieira A. D.; Mezzalira A., 2010. Microbiological and functional evaluation of an alternative device (OB®) for estrous synchronization in ewes. *Cienc. Rural.* 40, 389-395.

Merkx, J., Slob, A.K., van derWerff ten Bosh, J.J., 1988. Vaginal bacterial flora partially determines sexual attractiveness of female rats. *Physiol. Behav.* 44, 147-149.

Moffat, A.C., Jackson, J.V., Mass, M.S., Widdop, B., 1986. Clark's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluid, and post mortem material. *Pharmaceutical Press.* 2nd Edition. pp. 726-727.

Montossi, F., 2000. Programa nacional ovinos y caprinos, INIA. www.inia.org.uy/investigacion/programas/produccion/ovino_caprinos.html Accedido: 24/05/2007.

Moorthy, A.R.S. & Singh, S.P., 1982. Studies on the bacterial flora of the female genital tract of sheep. *Bull. Anim. Hlth. Prod. Afr.* 30, 15-18.

Ortavant, R., Pelletier, J., Ravault, J.P., Thimonier, J., Volland-Nail, P., 1985. Photoperiod: main proximal and distal factor of the circannual cycle of reproduction in farm mammals. *Oxford Rev. Reprod. Biol.* 7, 305-345.

Robinson, T.J., 1976. *The control of the ovarian cycle in the sheep*, 1st ed. Sydney University Press, Sydney.

Rubianes, E., Ungerfeld, R., 2002. Perspectivas de la investigación sobre reproducción ovina en América Latina en el marco de las actuales tendencias productivas. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 10, 117-125.

Scott-Moncrieff, J.C., Nelson, R.W., Bill, R.L., Matlock, C.L., Bottoms, G.D., 1990. Serum disposition of exogenous progesterone after intramuscular administration in bitches. *Am. J. Vet. Res.* 51, 893-895.

Scudamore, C.L., 1988. Intravaginal sponges insertion technique. *Vet. Rec.* 123, 554.

- Shalev, E., 2002. Ingestion of Probiotics: Optional treatment of bacterial vaginosis in pregnancy. *Isr. Med. Assoc. J.* 4, 357-360.
- Sheldon, I.M., Lewis, G.S., LeBlanc, S., Gilbert, R.O., 2006. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology* 65, 1516-1530.
- Singh, K.B., Mahajan, D.J., Tewari, R.P., 1996. Hormonal Modulation of the vaginal bacterial flora in experimental polycystic ovarian disease. *J. Clinic. Lab. Anal.* 10, 233-238.
- Suarez, G., Zunino, P., Carol, H., Ungerfeld, R., 2006. Changes in the aerobic vaginal bacterial mucous load and assessment of the susceptibility to antibiotic after treatment with intravaginal sponges in anestrous ewes. *Small Rumin. Res.* 63, 39-43.
- Tambler, A., 2009. Producción Ovina: Análisis y Perspectivas. www.mgap.gub.uy Accedido: 18/7/2010.
- Tilbrook, A.J., Lindsay, D.R., 1987. Difference in the sexual attractiveness of oestrus ewes to rams. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 17, 129-138.
- Tilbrook, A.J., Cameron, A.W.N., 1989. Ram mating preferences for woody rather than recently shorn ewes. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 24, 301-312.
- Ungerfeld, R., 2001. Efecto de la dosis de progestina y del tipo de administración sobre la fertilidad del celo inducido en ovejas durante el anestro estacional. Tesis de Maestría, PEDECIBA, Montevideo, Uruguay.
- Ungerfeld, R., 2002. Comportamiento sexual. En Ungerfeld, R. (Editor), Reproducción en los animales domésticos. Tomo I. Melibea, Montevideo, Uruguay. pp. 177-189.
- Ungerfeld, R., Dago, A.L., Rubianes, E., Forsberg, M., 2004. Response of anestrous ewes to the ram effect after follicular wave synchronization with a single dose of estradiol 17 β . *Reprod. Nut. Dev.* 44, 89-98.
- Ungerfeld, R., Silva, L., 2005. The presence of normal vaginal flora is necessary for normal sexual attractiveness of estrous ewes. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 93, 245-250.
- Vázquez, R., Orihuela, A., 2001. Effect of vaginal mucus and urine from ewes in estrus on plasma testosterone levels and weight gain of feedlot rams. *Small Rumin. Res.* 42, 173-177.
- Yasilmén, S., Ozyurtlu, N., Kucakaslan, I., Altan, F., 2008. The effect of progestagen on the changes of the vaginal flora arising from intravaginal sponge treatment and susceptibility of the vaginal flora to antibiotic in ewes. *J. Anim. Vet. Adv.* 7, 1418-1421.

Anexo 1

Changes in the Aerobic Vaginal Bacterial Mucous Load after Treatment with Intravaginal Sponges in Anoestrous Ewes: Effect of Medroxyprogesterone Acetate and Antibiotic Treatment Use

M Gatti¹, P Zunino² and R Ungerfeld¹

¹Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; ²Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay

Content

Intravaginal sponges (IS) impregnated with progestagens are widely used for oestrous synchronization in ewes. As progestogens depress the immuno response, the first aim was to determine whether medroxyprogesterone acetate (MAP) content affects the vaginal bacteria number (VBN) in IS-treated anoestrous ewes. The second aim was to compare the effectiveness of different antibiotic treatments to control the VBN increase caused by IS. In both experiments, IS were inserted during 14 days in anoestrous ewes. In the first, 11 ewes received commercial sponges (50 mg MAP), and 10 ewes received placebo sponges. For the second experiment, IS were inserted in three groups (n = 12/group), containing oxytetracycline im (20 mg/kg); injected into the sponge (0.02 mg), or control (no antibiotic). At sponge withdrawal, all ewes received 300 UI eCG. Mucous samples were collected from the vagina before sponge insertion, at sponge withdrawal, 24, 48 and 72 h later, and the VBN (colony-forming units per ml; CFU/ml) was counted after 48-h incubation. Medroxyprogesterone content did not affect VBN (log CFU/ml: 4.3 ± 0.2 vs 4.4 ± 0.2 with and without MAP, respectively). Bacterial number increased from 3.5 ± 0.2 at sponge insertion to 6.9 ± 0.1 at sponge withdrawal (p < 0.0001) and decreased the following day to 4.3 ± 0.2 (p < 0.0001). In the second experiment, VBN increased at sponge withdrawal (p < 0.0001) in all groups and decreased the following day (p < 0.0001). The CFU/ml at sponge withdrawal was lower in ewes treated with antibiotics (p < 0.0001), being even lower when local rather than systemic antibiotic was administered (log CFU/ml: 3.3 ± 1.8 vs 7.2 ± 1.8). The day of oestrous VBN was similar for all treatments and similar to that observed before sponge insertion. We concluded that MAP does not influence the increase in VBN, as the main effect is provoked by the sponge device itself, and local antibiotic treatment resulted in a lower bacterial growth than systemic treatments.

Introduction

Intravaginal sponges impregnated with progestogens are usually used for oestrous synchronization in sheep and goats. However, at sponge withdrawal, abnormal haemorrhagic and putrid vaginal discharge may be set free (Scudamore 1998; Suarez et al. 2006). In ewes, it has also been observed an important increase in the vaginal flora number (Amin 1996; Suarez et al. 2006). However, after sponge withdrawal, it is observed a drastic decrease in bacterial count, reaching the day of oestrous quantities similar to those observed before intravaginal sponge insertion, and similar also to those observed during natural oestrous (Suarez et al. 2006).

The abundant bacterial growth is mainly because of an abrupt increase in coliform bacteria being

Gram-negative *E. coli* and *Klebsiella* spp. the most isolated strains (Martins et al. 2009, 2010). The bacterial vaginal flora changes might affect the reproductive results, even if the main selected species are not pathogenic. In humans, the lipopolysaccharide (LPS) of Gram-negative bacteria provokes infertility and pregnancy losses through abnormal embryonic development and implantation failure (Deb et al. 2004a,b). In sheep and rats, it has been demonstrated a direct link between normal vaginal flora and sexual attractiveness (Merx et al. 1988; Ungerfeld and Silva 2005). If vaginal flora is depleted by the use of antibiotics, ewes are less attractive for rams, probably because of changes in vaginal environment and then chemical signals related to sexual selection (Ungerfeld and Silva 2005).

The vaginitis is caused by the sponge, as a foreign absorbent body. However, in cattle, sheep and pigs, it has reported that progesterone has immune depressor effects (Lewis 2003), which may be partially responsible of the increase in the bacterial load number (Sheldon et al. 2006). Therefore, the vaginitis may be consequence of both the contribution of the sponge to fluid absorption and retention, and the local immuno-suppression induced by the hormone itself. However, it has not been determined the importance of progestins in the vaginitis provoked by intravaginal sponges.

To avoid these negative effects, some commercial labs recommend preventing the vaginitis including broad spectrum antibiotics into the sponge. Suarez et al. (2006) compared the effectiveness of different antibiotics *in vitro* and suggested that oxytetracycline administration would be the most effective one to control the bacterial flora increase caused by the sponge. On the other hand, Gustafsson (1989) reported that infections of the reproductive tract may be avoided only when antibiotic is maintained in optimal concentration in the right place for a minimum length of time. According to this author, reproductive infections affect the local epithelium absorption capacity in bovines, determining low concentrations in the sub-mucosal tissue. Therefore, Gustafsson (1989) recommended systemic rather than local treatments for reproductive infections. On the other hand, local intravaginal antibiotic gel or cream is the preferred treatment for human vaginitis (Joeseof 1999; Shalev 2002).

Two experiments were performed using anoestrous ewes to avoid the influence of oestrous cycle period on the vaginal flora. The objective of the first experiment was to determine whether medroxyprogesterone acetate (MAP) impregnated into the intravaginal sponges is

	R	D	A	1	6	2	6	B	Dispatch: 9.4.10	Journal: RDA	CE: Mahindran
	Journal Name			Manuscript No.					Author Received:	No. of pages: 4	PE: Gomathi V

involved in the vaginitis provoked by its use. The second experiment aimed to compare the effectiveness of antibiotic treatments, administered either locally into the sponges before its insertion or systemically at the moment of sponge insertion, to control or decrease the negative effects caused by the intravaginal sponge. Total aerobic vaginal flora dynamics was determined in ewes treated with sponges with or without MAP, as it is the main parameter considered as a central indicator of vaginal bacterial flora disruption related to the sponges' insertion, following an approach that we have successfully used in a previous study (Suarez et al. 2006).

Materials and Methods

Animals and management

Two experiments were conducted in Campo Experimental 1 (Facultad de Veterinaria, Uruguay), located in Canelones, Uruguay (34°22'S, 55°36'W), during the non-breeding season (October–November). In both, nuliparous Corriedale X Milchschaaf ewes (37.9 ± 0.7 kg, mean ± SEM) were used. During the experimental period, ewes grazed on native pastures.

Experiment 1

Intravaginal commercial sponges (50 mg of MAP, Sincrovin, Lab. Santa Elena S.A., Montevideo, Uruguay) were inserted for 14 days in 11 ewes. A control group, (n = 10) received a placebo sponge of the same characteristics, but without MAP. Mucous samples were collected at sponge insertion and daily since sponge withdrawal for 3 days.

Experiment 2

In the second experiment, intravaginal sponges were inserted during 14 days in 36 Corriedale X Milchschaaf nuliparous ewes. Ewes were adjudicated to three groups (n = 12 each), receiving oxytetracycline i.m. (20 mg/kg; Oxilen, Lab. Vetanco, Buenos Aires, Argentina), or inserted into the sponge (0.02 mg). The third group remained as a control group without antibiotic. At sponge withdrawal, all ewes were received 300 UI eCG i.m. (Novormon, Syntex, Buenos Aires, Argentina). Mucous samples were daily collected since withdrawal until oestrous or 72 h later if during this time they did not come into oestrous.

Collection of vaginal mucous samples

Mucous samples were collected from the vagina, using sterile swabs by direct contact, without rubbing against the vaginal wall immediately before sponge insertion, and immediately after sponge withdrawal, and 24, 48 and 72 h later. The samples were maintained at 4°C until the microbiological analyses were carried out. Total aerobic bacterial were counted as described by Suarez et al. (2006). Briefly, swabs were vigorously vortexed in 1 ml sterile phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, for 1 min to suspend the bacteria. The resultant suspension was serially diluted and the bacteria were

counted on Blood Agar Plates and incubated for 48 h at 37°C.

Statistical analysis

The colony-forming units per ml (CFU/ml) were compared by analysis of variance (ANOVA) for repeated measures, after logarithmic transformation to normalize the distribution of the data.

Results

Experiment 1

Numbers of CFU/ml over time are presented in Fig. 1. Bacterial number changed on time ($p < 0.0001$), but was not affected by the fact that sponges contained MAP or not ($p = 0.7$). CFU/ml increased at sponge withdrawal ($p < 0.0001$) and decreased the following day ($p < 0.0001$), although values similar to those observed before sponge insertion were reached by the second and third days after sponge withdrawal.

Experiment 2

CFU/mL number was affected by time ($p < 0.0001$), treatment ($p = 0.004$), and there was an interaction between treatment and time ($p < 0.0001$). Vaginal bacteria account increased at sponge withdrawal ($p < 0.0001$) in all groups and decreased the following day to values similar to those observed before sponge insertion 48 and 72 h after sponge withdrawal ($p < 0.0001$; Fig. 2), returning to basal levels after 24 h collection. The CFU/ml at sponge withdrawal was lower in ewes treated with antibiotics ($p < 0.0001$). However, the total vaginal bacteria were lower when local rather than systemic antibiotic was administered. Vaginal bacterial number ($p < 0.0001$) at the day of oestrous day was similar for all treatments and similar to that observed before sponge insertion.

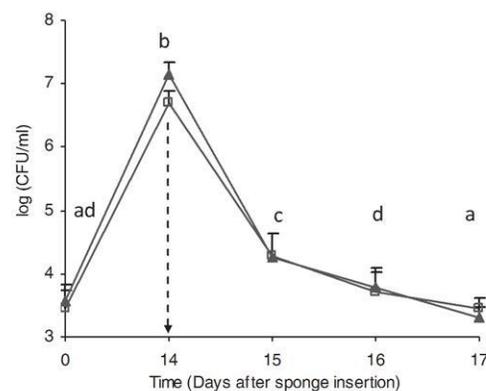


Fig. 1. Vaginal bacterial count expressed as log colony-forming unit/ml (CFU/ml). Ewes were treated with sponges with (□) or without (▲) medroxyprogesterone. Day 0 = sponge introduction; Day 14 = sponge withdrawal; Day 15 = 24 h; Day 16 = 48 h; and Day 17 = 72 h. Different letters: $p < 0.05$

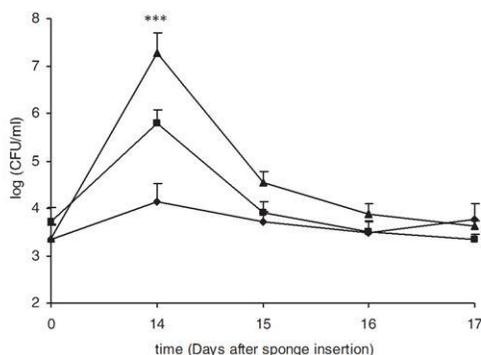


Fig. 2. Vaginal bacterial count expressed as log colony-forming unit/ml (CFU/ml). Ewes were treated with sponges, and systemic antibiotic (■); local antibiotic (◆); or without antibiotic (▲). Day 0 = sponge introduction; Day 14 = sponge withdrawal; Day 15 = 24 h; Day 16 = 48 h; and Day 17 = 72 h. * $p < 0.0001$ for different treatments

Discussion

We demonstrated that medroxyprogesterone content did not influence the increase in total aerobic vaginal bacteria observed when intravaginal sponges are used for oestrous synchronization in ewes. This may mean that the presence of a foreign body (sponge) in the vaginal cavity causes a maximum increase in the bacterial level, as reported by Suarez et al. (2006), but also that response is not increased by the effect of MAP impregnation in the sponge. There are two possible explanations: MAP itself, when administered locally through intravaginal sponges may not contribute to the vaginitis, or the sponge itself, with constant absorption and retention of the vaginal secretions by the intravaginal sponge, may provoke the maximum bacterial growth. It remains to be determined whether MAP itself affects the immune response in local administration, as it happens with other progestins (Lewis 2003).

The local antibiotic treatment was more effective than the systemic treatment in decreasing the bacterial growth. Also, both treatments partially controlled the flora increase provoked by sponge treatments. Overall, *in vivo* oxytetracycline treatments were effective in decreasing the bacterial growth provoked by sponge treatments, but local administration delayed and controlled better the response than systemic treatments.

In both experiments, CFU/ml from all groups returned to similar values than those observed before sponge insertion 24–48 h after sponge withdrawal. It seems that as a consequence of the accumulation of mucous provoked physically by the sponge, there is a local immune response which seems to be the responsible of the bacterial decrease after withdrawal or until oestrous. Suarez et al. (2006) observed the presence of an important number of macrophages after sponge withdrawal, reflecting that response. As the number decreases after progestagen concentrations decrease, hormonal regulation of oestrous may be involved in

the natural control of vaginitis induced by sponge treatments.

Overall, we conclude that the MAP content does not contribute to the vaginitis provoked by sponge treatments and that local antibiotic treatment is more effective than systemic treatment to control the bacterial flora increase provoked by sponge insertion. Although we did not explore effects on fertility or sexual attractiveness, the information presented allows us to consider managements to avoid those negative effects of the use of intravaginal sponges.

Acknowledgements

Authors thank Dr. Fernando Perdigón, responsible from the Campo Experimental, Tec. Aux. Eloisa Pettinari for technical support with sponge cleaning, María Noel Castro and Alberto Salazar for help with animal management and laboratory tasks, and Laboratorios Santa Elena and Fundaciba for financial support.

Conflict of Interest

XXXXXXX.

Author contributions

All authors contributed in the study. Marcelo Gatti is postgraduate student at the Facultad de Veterinaria (Montevideo, Uruguay), Rodolfo Ungerfeld is his advisor and Pablo Zunino his co-advisor. Ungerfeld is responsible for the study design, and Zunino for the microbiological studies. Gatti performed the field and lab work. The manuscript has been written and approved by the 3 authors.

References

- Amin JD, 1996: Effect of fluorogestone acetate impregnated intravaginal sponges on vaginal flora of ewes. *Nigerian J Anim Prod* **23**, 98–100.
- Deb K, Chaturvedi MM, Jaiswal YK, 2004a: Comprehending the role of LPS in Gram-negative bacterial vaginosis: oging into the causes of unfulfilled child-wish. *Arch Gynecol Obstet* **270**, 133–146.
- Deb K, Chaturvedi MM, Jaiswal YK, 2004b: Gram-negative bacterial endotoxin- induced infertility: a birds eye view. *Gynecol Obstet Invest* **57**, 224–232.
- Gustafsson BK, 1989: Tendencias actuales en la terapia de las infecciones uterinas. (XVII Jornadas Uruguayas de Buiatria. Paysandú, Uruguay. 16–18 Junio 1989). K1–K8.
- Joesoef MR, 1999: Bacterial vaginosis: review of treatment options and potential clinical indications for therapy. *Clin Infect Dis* **28**(Suppl. 1), 557–565.
- Lewis GS, 2003: Steroidal regulation of uterine resistance to bacterial infection in livestock. *Reprod Biol Endocrinol* **1**, 117–124.
- Martins G, Figueira L, Penna B, Brandao F, Vargas R, Vasconcelos C, Lilenbaum W, 2009: Prevalence and antimicrobial susceptibility of vaginal bacteria from ewes treated with progestin-impregnated intravaginal sponges. *Small Rumin Res* **81**, 182–184.
- Martins LT, dos Santos PC, Neto SG, Rauber LP, Bertolini M, Vieira AD, Mezzalana A, 2010: Microbiological and functional evaluation of an alternative device (OB[®]) for oestrous synchronization in ewe. *Ciencia Rural (Brasil)* **????**, **????**–**????**. in press.
- Merckx J, Slob AK, van derWerff ten Bosch JJ, 1988: Vaginal bacterial flora partially determines sexual attractiveness of female rats. *Physiol Behav* **44**, 147–149.

- 1 Scudamore CL, 1998: Intravaginal sponges insertion tech-
2 nique. *Vet Rec* **123**, 554.
- 3 Shalev E, 2002: Injection of probiotics: optional treatment of
4 bacterial vaginosis in pregnancy. *Isr Med Assoc J* **4**, 357–360.
- 5 Sheldon IM, Lewis GS, LeBlanc S, Gilbert RO, 2006: Defining
6 postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology* **65**,
7 1516–1530.
- 8 Suarez G, Zunino P, Carol H, Ungerfeld R, 2006: Changes in
9 the aerobic vaginal bacterial mucous load and assessment of
10 the susceptibility to antibiotic after treatment with intrava-
11 ginal sponges in anestrous ewes. *Small Rumin Res* **63**, 39–43.
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30
- 31
- 32
- 33
- 34
- 35
- 36
- 37
- 38
- 39
- 40
- 41
- 42
- 43
- 44
- 45
- 46
- 47
- 48
- 49
- 50
- 51
- 52
- 53
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60
- 61
- 62
- 63
- Ungerfeld R, Silva L, 2005: The presence of normal vaginal
flora is necessary for normal sexual attractiveness of estrous
ewes. *Appl Anim Behav Sci* **93**, 245–250.
- Submitted: 14 Feb 2010; Accepted: 23 Mar 2010
- Author's address (for correspondence): R Ungerfeld, Departamento de
Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República,
Montevideo, Uruguay. E-mail: rungerfeld@gmail.com 

