

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

**“FACILITACIÓN DE LA CANULACIÓN
CERVICAL EN OVEJAS MEDIANTE LA
ADMINISTRACIÓN DE CARBETOCINA O
PROSTAGLANDINA E2”**

Por:

ARRILLAGA LÓPEZ, Gonzalo

CLIVIO YAVICOLLI, Luis

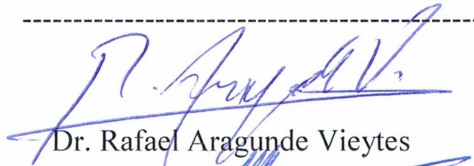
TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias
Orientación: Producción Animal

MODALIDAD: Ensayo Experimental

Montevideo
Uruguay
2018

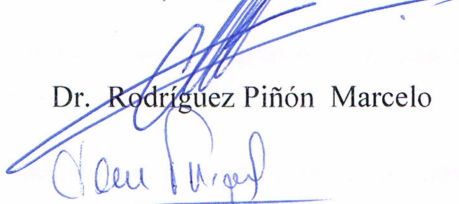
PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de Grado aprobada por: -----

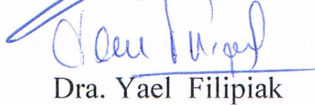

Dr. Rafael Aragunde Vieytes

Presidente de Mesa:

Segundo Miembro (tutor):


Dr. Rodríguez Piñón Marcelo

Tercer Miembro:


Dra. Yael Filipiak

Cuarto Miembro (co-tutor):


Dr. Danilo Fila


Fecha: 20 de Diciembre 2018

Autores: -----

Br. Gonzalo Arrillaga López

Br. Luis Clivio Yavicolli

FACULTAD DE VETERINARIA

Aprobado con 10 (diez) 

AGRADECIMIENTOS:

Agradecemos a esas personas que a lo largo de nuestra carrera han puesto su granito de arena para que nosotros estemos donde estamos. A nuestros tutores, Dr. Marcelo Rodríguez y Dr. Danilo Fila, por su tiempo brindado, para nosotros ha sido un placer compartir este tiempo de aprendizaje y experimentación bajo su tutela.

A la Facultad, por formar profesionales aptos para desarrollarse en diversas áreas de trabajo.

Agradecemos a todas esas personas que están y los que ya no están a nuestro lado pero son parte del camino recorrido, por su apoyo, incentivo y tirones de orejas, que nos ayudaron a ser mejores seres humanos y formarnos como profesionales.

A la familia y los amigos por estar siempre, sea cual sea el motivo. ¡Gracias!

Y por último, agradecemos al grupo experimental de trabajo que se desarrolló de forma amena y formó una célula de trabajo sumamente agradable, cuestión fundamental en cualquier ámbito de la vida.

¡A todos, muchas gracias!

TABLA DE CONTENIDO

Página de aprobación	2
Agradecimientos:.....	3
Lista de Figuras.....	5
Resumen.....	6
Summary.....	7
Introducción.....	9
Hispótesis.....	14
Objetivos	14
Objetivo general.....	14
Objetivos Específicos.....	14
Materiales y métodos	15
Diseño experimental	15
Tratamientos	15
Medición de la penetrabilidad cervical	16
Análisis Estadístico	17
Resultados	18
Discusión.....	19
Conclusiones.....	21
Bibliografía	22

LISTA DE FIGURAS:

Página 13:

Figura 1. Incremento de la penetrabilidad cervical (penetrabilidad a las 0hrs. post eCG=0cm, mean±sem) en ovejas sincronizadas con medroxiprogesterona (60 mg intravaginal (i.v.)) por 13 días y eCG (300 UI). A las 42 hrs., post eCG, se trataron para inducir la dilatación cervical con Carbetocina i.m (Cb., 1µg/Kg, intramuscular (i.m) y dispositivo intravaginal (i.v.) placebo), Dinoprostone (Dp., 10mg dispositivo intravaginal (i.v.)e inyección (i.m.) placebo), ambos tratamiento combinados (Cb. y Dp.) y dispositivo i.v. placebo e inyección i.m. placebo (C). A las 0, 42 y 54hrs., post eCG, n=10 en cada grupo y a las 68hrs., post eCG, n=5 en cada grupo. Las diferencias se indican con letras (P<0.05), un asterisco (P=0.0548) o dos asteriscos (P=0.0614) (Rodríguez y Barreto 2017).

Página 17:

Figura 2. Penetrabilidad cervical (cm) en ovejas luego de la administración de 300 UI de eCG (hrs. post-eCG), previo tratamiento con esponjas intravaginales de MAP (60 mg) por 7 días. A las 30 hrs., post eCG, las ovejas fueron tratadas con 40 µg de Carbetocina i.m (Cb., n=15), un dispositivo i.v. de liberación lenta con Dinoprostone (Dp., n=15) o no tratadas (C, n=15). Letras distintas indican diferencias entre hrs. post-eCG (P<0.02).

RESUMEN

El experimento propone la utilización de análogos sintéticos de Oxitocina (Carbetocina, Cb.) y PGE2 (Dinoprostone, Dp.) para inducir la dilatación del cérvix de ovejas Corriedale, con el fin de aportar al desarrollo de estrategias para facilitar la inseminación artificial transcervical y aumentar la eficiencia reproductiva. En un experimento previo, la administración de Cb. y/o Dp. a ovejas, 42hrs. luego de la sincronización de la ovulación con medroxiprogesterona durante 14 días (MAP) y eCG (42hrs. post-eCG), logró mantener la penetrabilidad cervical máxima desde el momento del tratamiento hasta las 68 hrs. post eCG. El retraso a los valores iniciales de penetrabilidad (0 hrs. post-eCG), luego del momento esperado para la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF, 54 h post-eCG) registrada en los animales tratados con Cb y/o Dp., podría afectar la fertilidad por prolongar la permeabilidad cervical más allá del momento de la fertilización.

El objetivo de este ensayo experimental es evitar el retraso a los valores de penetrabilidad inicial, e incrementar la penetrabilidad al momento de la IATF, adelantando los tratamientos de inducción a la dilatación cervical.

Se realizó la elección, pesado, identificación y sincronización de la ovulación de 45 ovejas Corriedale, mediante una dosis de 150µg de Prostaglandina F2α i.m. (Glandinex, Laboratorio Universal, Montevideo), junto con la inserción intravaginal durante 7 días de esponjas con 60mg de MAP (Progespon®, Syntex, Buenos Aires) y, a su retiro, administrar 300 UI de eCG i.m. (Novormón, Syntex, Buenos Aires). Las ovejas fueron tratadas en tres grupos de 15 animales, el primero a las 30hrs. post-eCG con 40 µg i.m. de Carbetocina (Cb.) (Decomotón, Laboratorios Callier, Uruguay) (grupo Cb.), un segundo con un dispositivo i.v. de liberación lenta con 10mg de Dinoprostone (Dp.) (Propess®, Ferring Pharmaceuticals Ltd., West Drayton, Reino Unido) (grupo Dp.) y un tercero de ovejas no tratadas o grupo control (C) (n=15 en cada grupo). En cada oveja se determinó en cuatro instancias la penetrabilidad cervical mediante la introducción transcervical de una sonda de canulación graduada a las 0, 30, 54 y 72hrs. post-eCG.

El tratamiento con Cb. o Dp. 30hrs. post-eCG no produjo diferencias de penetrabilidad cervical entre los grupos tratados y el control, en ninguno de los momentos post-eCG medidos. Se concluye que adelantar los tratamientos de inducción de la penetrabilidad cervical con Cb. o Dp., no logró aumentar la penetrabilidad al momento de la IATF, ni modificar el patrón temporal de la penetrabilidad.

SUMMARY

The experiment proposed to use synthetic analogues of Oxytocin (Carbetocin) (Cb.) and PGE₂ (Dinoprostone) (Dp.) to produce cervical dilatation in Corriedale ewes, in order to contribute to the development of strategies to facilitate transcervical artificial insemination and increase reproductive efficiency. In a previous experiment, the administration of Cb. and / or Dp 42hrs after synchronization of ovulation on ewes with medroxyprogesterone during 14 days (MAP) and eCG (42hrs. post-eCG), managed to maintain maximum cervical penetrability from the time of treatment until 68hrs. post eCG. The delay to the initial values of penetrability (0hrs. post-eCG) after the expected time for artificial insemination at fixed time (IATF, 54hrs. post-eCG) recorded in animals treated with Cb. and / or Dp. could affect fertility, because it prolongs the cervical permeability beyond the time of fertilization. The objective of this study was to decide the effect of Cb. or Dp. treatments on cervical penetrability at the time of artificial insemination at fixed time (IATF, 54hrs. post eCG) in vivo. A total of 45 multiparous Corriedale ewes were used, which were assigned to 3 random groups, all of them synchronized with an impregnated sponge with 60mg of medroxyprogesterone acetate (MAP, Syntex, Buenos Aires, Argentina) during 7 days and 300 IU of eCG i.m. (Novormon 5000®, Syntex, Buenos Aires, Argentina) when the sponge was removed. The assigned treatments were: GRUPO I Carbetocina, 40 µg (2mL) i.m. of Cb. (Decomotón, Laboratorios Callier, Uruguay); GRUPO II Dinoprostone, 10mg Dp. in a slow release i.v. device (Propess®, Ferring Pharmaceuticals Ltd., West Drayton, UK); GRUPO III, without treatments calling control group (C). Cervical penetrability was measured at 0, 30, 54 and 70hrs. in all animals. In every sheep, the cervical penetrability was determined by the introduction of a transcervical graduated cannulation probe at 0, 30, 54 and 72hrs. post-eCG. The treatment with Cb. or

Dp. 30hrs. post-eCG did not produce differences of cervical penetrability between the treated groups and the control in any of the post-eCG moments measured. It is concluded that advancing cervical penetrability induction treatments with Cb. or Dp. failed to increase the penetrability at the time of the IATF, and could not modify the temporal pattern of penetrability.

INTRODUCCIÓN

La producción ovina es un rubro importante en el país, aunque, el stock total del ganado ovino ha disminuido de unos 24.5 millones de cabezas en los años 90 a 6.5 millones al año 2017 (Declaración Jurada Anual de Existencias DICOSE-SNIG 2017). Aun así su cría sigue siendo un negocio muy rentable. Es de esperar que la concreción de la apertura del mercado americano para la carne con hueso y las perspectivas del aumento en el precio de la lana, presionen a favor del comienzo de la recuperación del stock ovino (OPYPA 2017). Esto lleva a que nos estemos informando, actualizando y creando nuevas líneas de investigación para optimizar dicha producción.

La Inseminación artificial (I.A.) es una biotecnología utilizada en el ámbito de la reproducción, que consiste en depositar el semen extraído de un macho, procesado correctamente y depositado en los genitales de una hembra en el momento adecuado y con el instrumental indicado, con el fin de obtener una preñez.

Ventajas: Mejoramiento genético masivo, mejor control de vientres, control sanitario del rodeo, conducción de mejores programas reproductivos, utilización de semen de alta calidad, mayor aprovechamiento del carnero y se minimiza el riesgo de uso de carneros.

Desventajas: Empleo de carneros no adecuados, necesidad de personal capacitado, mayor mano de obra y reducción del pool genético.

La inseminación artificial (IA.) es uno de los métodos más importantes de la reproducción asistida pero, posee dos grandes limitantes, estas son: la calidad del semen de carneros, que es sensible al proceso de congelado-descongelado causado por la crío conservación y, por otro lado, la anatomía del cuello uterino de la oveja que, en la mayoría de las ovejas no permite el paso transcervical de una pipeta inseminante para lograr la inseminación intrauterina (Salamon y Maxwell 2000; Falchi 2012).

Para poder usar dicha biotecnología debemos tener el conocimiento adecuado del ciclo estral, por lo que haremos un breve recordatorio. Este es un conjunto de eventos fisiológicos que se repiten sucesivamente, la oveja tiene un ciclo

estral con una duración promedio de 17 días. Son poliéstricas estacionales de día corto. Según lo planteado por Rodolfo Ungerfeld, en su libro Reproducción de Animales domésticos, el ciclo se puede dividir en una fase luteal (con la presencia de un cuerpo lúteo activo) que se extiende desde el día 2 – 3 (celo=día 0) del ciclo, hasta alrededor del día 13 y una fase folicular que va desde la luteólisis (regresión del cuerpo lúteo) que se produce el día 13 – 14 hasta el día 2. A su vez, podemos dividir la fase folicular en 2 periodos: el Proestro (desde el comienzo de la luteólisis hasta el inicio del celo) y el Estro (celo) y la fase Luteal en metaestro (desde el final del celo hasta la formación del cuerpo lúteo) y diestro (presencia de cuerpo lúteo activo).

La anatomía del cérvix ovino es compleja por ser pequeño, estrecho y poseer anillos que restringen la luz del canal cervical (Moré 1984; Halbert y col., 1990a, Campbell y col., 1996; Kershaw y col., 2005), tornándose una poderosa barrera fisiológica contra gérmenes patógenos que atentan contra la concepción. En 1994, Eppleston y col., informaron una relación importante entre el sitio de deposición del semen en el tracto reproductivo de la oveja y las tasas de fertilidad logradas. La canulación transcervical nos permite aumentar la tasa de concepción en aproximadamente un 10% por cada centímetro de canulación intracervical (Buckrell 2000), pero es limitada por la dificultad que esta ofrece (Salamon y Maxwell 2000).

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

Es sabido que durante el estro ocurre cierto grado de dilatación natural del cérvix de la oveja, el cual, sería promovido por la alta relación estrógenos/progesterona circulante (Halbert y col., 1990). El momento de máxima penetración cervical en el período preovulatorio coincide con altas concentraciones de LH y estradiol, que sugieren que podrían ser responsables de la relajación del cuello uterino, probablemente a través de una vía mediada por Oxitocina y PGE2 (Falchi y col. 2012). Este entorno hormonal produciría cambios cualitativos y cuantitativos en la composición de la matriz extracelular cervical, desagregando y degradando activamente el colágeno, lo que produciría la dilatación del cérvix (revisado en Rodríguez-Piñón 2015).

En el tejido cervical, dicha señal hormonal se amplificaría en forma autócrina y/o parácrina mediante el sistema oxitocina/prostaglandina. Si bien la administración de Ox. Aumenta la penetrabilidad cervical y disminuye la fertilidad (Stellflug y col., 2001, King y col., 2004, Candappa y Bartlewski 2012), dichos efectos podrían ser adjudicados a la utilización de dosis supra-fisiológicas de Ox. (10 a 400 UI), considerando que el aumento de Ox. en respuesta a la estimulación cérvico-vaginal de la canulación cervical fue reproducido mediante la administración intravaginal (i.v) de solo 100 UI de Ox. (Houdeau y col., 2002). En este sentido y, considerando la corta vida media de la hormona (minutos), (King y col., 2004) sugirieron que sería más efectivo administrar una serie de dosis pequeñas, antes que una única dosis, imitando los pulsos de Ox. que ocurrirían durante el estro natural (Wathes y col., 1986, Gilbert y col., 1991). Sin embargo, este tipo de administración quedaría restringida a la aplicación experimental.

Actualmente, existe en el mercado un análogo sintético de la Ox, la Carbetocina (Cb.), cuya actividad de unión al receptor de Ox. es similar al de la Ox. natural (Engstrøm y col. 1998) y su vida media se prolonga por algunas horas (Bajcsy y col.; 2006). Este sería un período de tiempo compatible con el complejo mecanismo de cascada de señales descrito para desencadenar los procesos de remodelación del colágeno cervical, sin necesidad de usar administraciones repetidas o altas dosis. Hemos encontrado un solo trabajo en bovinos donde la Cb. fue utilizada para inducir la dilatación cervical al parto en

bovinos, con resultados positivos sobre esta (Zobel y Taponen 2014) pero, no hemos encontrado reportes de la utilización de Cb. en ovinos.

A pesar de que las evidencias indican que, la prostaglandina vinculada a los procesos de remodelación del colágeno cervical es la prostaglandina E2 (PGE2) (Ellwood y col., 1980, Ledger y col., 1983, Shemesh y col., 1997, Fuchs y col., 2002, Wu y col., 2005), la prostaglandina más utilizada experimentalmente en ovinos, como inductor de la dilatación cervical, es un análogo sintético de la prostaglandina E1 (Misoprostol), con el cual se logró aumentar la penetrabilidad cervical en ovejas ciclando con respecto a los controles (Leethongdee y col., 2007). Más recientemente, se ha reportado que el Dinoprostone (Dp.), un análogo de la prostaglandina E2 en un dispositivo i.v. de liberación lenta, ha aumentado la penetrabilidad cervical en ovejas en anestro y ciclando de razas carniceras (Candappa y col., 2014; Bartlewski y Candappa, 2015).

Como antecedente directo, se realizó un experimento en ovejas ciclando, utilizando Cb. y Dp. como inductores de la dilatación cervical (Rodríguez y Barreto 2017). En ese trabajo se realizaron tratamientos con Cb. i.m. y Dp. i.v en ovejas Corriedale ciclando sincronizadas con esponjas de medroxiprogesterona (MAP) por 13 días y eCG al retiro de la misma, estableciéndose el momento esperado para la IATF 54hrs post-eCG. La administración de Cb. y/o Dp. 12hrs antes del momento esperado para la IATF (a las 42hrs. post-eCG), logró un aumento significativo de la penetrabilidad cervical al momento de la IATF, evitando la caída de la penetrabilidad en el intervalo intra tratamiento, que se tradujo en un atraso del retorno a los valores iniciales de penetrabilidad en las horas siguientes a la IATF, lo cual, no sería favorable para la fertilidad por prolongar la permeabilidad cervical, más allá del momento de la fertilización.

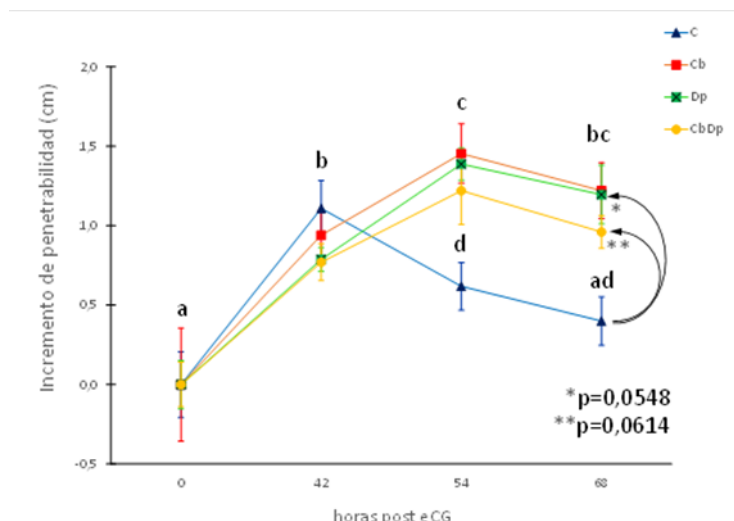


Figura1. Incremento de la penetrabilidad cervical (penetrabilidad a las 0hrs. post eCG=0cm, mean±sem) en ovejas sincronizadas con medroxiprogesterona (60 mg i.v.) por 13 días y eCG (300 UI). A las 42 hrs., post eCG, se trataron para inducir la dilatación cervical con Carbetocina (Cb., 1µg/Kg, intramuscular (i.m) y dispositivo i.v. placebo), Dinoprostone (Dp., 10mg dispositivo i.v. e inyección i.m. placebo), ambos tratamiento combinados (Cb. y Dp.) y dispositivo i.v. placebo e inyección i.m. placebo (C). A las 0, 42 y 54hrs., post eCG, n=10 en cada grupo y a las 68hrs., post eCG, n=5 en cada grupo. Las diferencias se indican con letras ($P<0.05$), un asterisco ($P=0.0548$) o dos asteriscos ($P=0.0614$) (Rodríguez y Barreto 2017)

Los datos sugieren que, adelantar la aplicación de éstos tratamientos podría favorecer a que se produzca una diferencia significativa de la penetrabilidad al momento de la IATF y no prolongar demasiado el regreso a los valores iniciales de penetrabilidad. Este trabajo consiste en adelantar la aplicación del tratamiento hormonal con Cb. o Dp. para lograr un aumento en la penetrabilidad cervical al momento de la IA y evitar un atraso del retorno a los valores iniciales de penetrabilidad, para disminuir el tiempo de exposición del útero a patógenos que, posiblemente, ingresarían vía cervical. Se busca obtener evidencias experimentales sobre la utilización de análogos sintéticos de Ox. (Cb.) y PGE2 (Dp.) para producir la dilatación del cérvix de ovejas Corriedale durante un corto período de tiempo, con el fin de aportar al desarrollo de estrategias para facilitar la IA transcervical y aumentar la eficiencia reproductiva del rubro ovino.

HIPÓTESIS

La Cb i.m. o el Dp i.v administradas 30hrs post eCG a ovejas sincronizadas con PGF2alfa, MAP y eCG, produce un aumento en la penetrabilidad cervical al momento esperado de la IATF y una disminución posterior similar a los controles.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el efecto del tratamiento con Cb. o Dp. 24hrs antes del momento en que se realizaría la inseminación artificial a tiempo fijo (54hrs. post eCG), sobre la penetrabilidad cervical desde la hora 0 hasta las 72hrs. post eCG en ovejas Corriedale sincronizadas, con PGF2 α , MAP por 7 días y eCG al momento del retiro de la esponja.

Objetivos Específicos

- 1- Determinar el efecto de la administración i.m. de Cb. 24hrs antes del momento de la IATF sobre la penetrabilidad cervical en ovejas sincronizadas con PGF2 α ,MAP por 7 días y eCG.
- 2- Determinar el efecto de la administración i.v. de Dp 24hrs, antes del momento de la IATF sobre la penetrabilidad cervical en ovejas sincronizadas con PGF 2 α , MAP por 7 días y eCG.
- 3- Determinar si la distribución de celos es afectada por los tratamientos y su vinculación con la penetrabilidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

Se seleccionaron 45 ovejas Corriedale multíparas, provenientes de una misma majada, con un peso homogéneo y un estado corporal de 2.5 a 3.5, CC en la escala de 0 – 5 de Russel y col., (1969) y alimentadas con pasturas naturales.

El ensayo se realizó en el campo experimental N^o1, Estación Miguez, de la Facultad de Veterinaria, Canelones, Uruguay. En la fecha comprendida entre el 27 de Marzo al 6 de Abril de 2017.

Todas las ovejas fueron tratadas con el protocolo PGF 2 α , MAP-eCG diseñado para realizar una IATF a las 54hrs. post-eCG. El mismo consistió en la sincronización de la ovulación, administrando 150 microgramos de PGF2 α i.m. (Glandinex, Lab. Universal. Montevideo), conjuntamente con esponjas i.v. impregnadas con 60mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP, Syntex, Buenos Aires, Argentina) por 7 días y, al momento de retirar la esponja, 300 UI de eCG i.m. (Novormon 5000®, Syntex, Buenos Aires, Argentina). Los animales permanecieron con 2 capones androgenizados, marcados con tiza desde el momento de la eCG hasta el final del experimento, a los efectos de detectar el comienzo del celo.

Tratamientos

El Grupo Cb. se trató con 40 μ g (2mL) i.m. de Carbetocina (Decomotón, Laboratorios Callier, Uruguay). El Grupo Dp. fue tratado con 10mg de Dinoprostone con un dispositivo i.v. de liberación lenta (Propess®, Ferring Pharmaceuticals Ltd., West Drayton, Reino Unido), se realizó la aplicación de dichos dispositivos i.v., lo más próximo al anillo cervical caudal, para lo cual, se utilizó un vaginoscopio, colocando el animal con el tren posterior elevado, utilizando para esto, un caballete de madera acolchonado en la parte donde se apoyó la oveja. Al Grupo C no se le administro nada, se lo utilizó como control. Durante el trabajo se produjo la ruptura de un frasco de eCG el cual fue remplazado en el momento por uno eCG con fecha de vigencia caducada (vencido por 2 meses), las ovejas tratadas con la eCG vencida fueron distribuidas aleatoriamente y analizadas particularmente.

En todos los animales se midió la penetrabilidad cervical a las 0hrs. (al retiro de la esponja e inmediatamente antes de la administración de eCG), 30hrs. (posterior los tratamientos de inducción a la dilatación cervical), 54hrs. (momento de la IATF) y a las 72hrs. (post inducción hormonal). La actividad la podemos dividir en 2 etapas:

A las 30hrs. post-eCG, las ovejas fueron asignadas aleatoriamente a tres Grupos de tratamientos (Grupos Cb, Dp, y C, n=15 en cada uno) y tratadas

Calendario de actividades:

1- Sincronización de celos:

Días	1	2	3	4	5	6	7
	PGf2 α +MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	Retiro MAP +eCG

2- Control de penetrabilidad:

Días	7	8	9	10
Horas post eCG	0	30	54	72
Actividad	eCG + Medición	Cb o Dp + Medición	Medición	Medición

Medición de la penetrabilidad cervical

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

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos de penetrabilidad cervical (mm) se analizaron mediante ANOVA, para muestras repetidas (StatisticalAnalysisSystems SAS Institute, Cary, NC, EEUU, 2000), incorporando al análisis el efecto fijo del grupo de tratamiento (Cb., Dp. y C.) y las hrs. post eCG. Los datos están presentados como medias s.e.m., con diferencias consideradas significativas para $P < 0,05$. El efecto de los grupos experimentales y de la eCG utilizada (vencida o no), sobre la frecuencia y distribución de celos, fue analizado por Chi cuadrado.

RESULTADOS

No hubo efecto de grupo experimental sobre la penetrabilidad cervical ($P=0.41$), si hubo efecto del tiempo post-eCG ($P<0.0001$). En los tres grupos experimentales la penetrabilidad aumentó luego del retiro de la MAP y la administración de la eCG, hasta llegar a un máximo a las 54hrs. post-eCG para luego decaer (Figura 1).

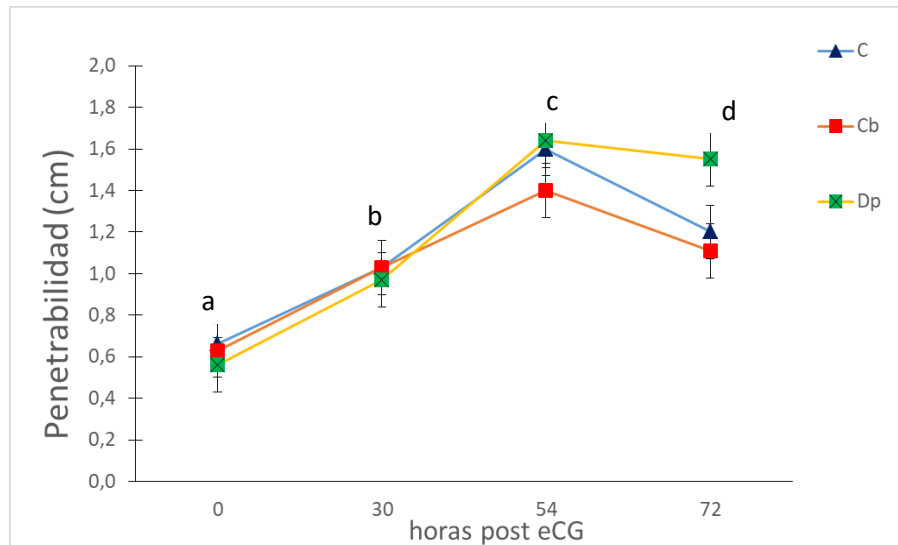


Figura 2. Penetrabilidad cervical (cm) en ovejas luego de la administración de 300 UI de eCG (hrs. post-eCG), previo tratamiento con esponjas i.v. de MAP (60 mg) por 7 días. A las 30 hrs., post eCG, las ovejas fueron tratadas con 40 μ g de Carbetocina (Cb., $n=15$), un dispositivo i.v. de liberación lenta con Dinoprostone (Dp., $n=15$) o no tratadas (C, $n=15$). Letras distintas indican diferencias entre hrs. post-eCG ($P<0.02$).

El máximo de penetrabilidad (cm) logrado, coincidió con el momento esperado para la IATF, siendo 1.4 ± 0.13 , 1.6 ± 0.13 y 1.6 ± 0.13 para los grupos Cb., Dp. y C. respectivamente.

La distribución de celos, luego de la administración de eCG, no fue afectada por el grupo experimental. El 48% de las ovejas mostraron celo a las 30hrs post eCG (22/45) y el 24% (11/45) a las 54hrs. post eCG, mientras que un 28% (13/45) no fueron detectadas en celo ($P=0.93$).

La utilización de eCG vencida tampoco afectó la distribución de celos, siendo 4 de 10 (40%) las ovejas que no mostraron celo utilizando la eCG vencida y 9 de 36 (25%) utilizando la eCG en fecha ($P=0.64$), lo cual permite decir que los resultados obtenidos no se deberían a la utilización de la eCG vencida.

DISCUSIÓN

En todos los grupos, la penetrabilidad de las 0 a las 54hrs fue aumentando, para luego comenzar a descender. Esto coincide con que el 67% de las ovejas detectadas en celo (22 de 33) comenzaron el mismo a las 30hrs. post eCG. Por lo cual, considerando que la ovulación en la oveja tiene una duración aproximada de 22hrs (Goodman y Inskeep, 2006), la ovulación probablemente se produjo alrededor del momento esperado de la IATF (54hrs. post eCG). El aumento de la penetrabilidad en la medida que se produce el crecimiento del folículo dominante y aumentan los niveles de estrógenos, coincide con lo reportado anteriormente (Halbert y col. 1990, Leethongdee y col 2007, Rodríguez Barreto 2017). Falchi y col. (2012), al igual que nosotros, encontraron que el máximo de penetrabilidad se daba a las 54hrs. post-eCG en ovejas ciclando Ile de France, utilizando esponjas i.v. de acetato de fluorestageno durante 12 días y, al remover la misma administraron 500 UI eCG. En la tesis de Rodríguez y Barreto (2017), donde utilizaron un protocolo que consistió en la administración i.v. de una esponja impregnada con 60 mg de acetato de medroxiprogesterona por 13 días y la administración de 300 UI de eCG i.m., el momento de máxima penetrabilidad se dio a las 42hrs. (post eCG) para luego comenzar a decaer y llegar a un mínimo a las 72hrs. Por otro lado, Leethongdee y col (2007) utilizaron esponjas i.v. de progesterona durante 12 días, seguidos de eCG en el momento de retiro de la esponja. En el experimento 1, la dosis utilizada fue de 250 UI de eCG, mientras que en experimento 2, se utilizaron 500 UI y obtuvieron el máximo de penetrabilidad a las 72hrs., para luego disminuir. Esta diferencia podría deberse al tipo de protocolo de sincronización utilizado en cada uno de los ensayos (tratamientos largos vs. Cortos de MAP), a la cantidad de eCG administrada (300UI o 400UI) o a diferencias entre las razas utilizadas.

El tratamiento con Cb. o Dp. 30hrs. post-eCG, no produjo diferencias de penetrabilidad cervical entre los grupos tratados y el control en ninguno de los momentos post-eCG medidos. De la misma forma, los tratamientos no afectaron la frecuencia y distribución de celos. Sin embargo, Rodríguez y Barreto (2017), observaron por ecografía ovárica que un tercio de las ovejas tratados con Cb. ovularon luego del tratamiento y más tarde que el resto de los

animales. Los resultados de ambos experimentos muestran que el potencial efecto de la Cb. sobre el momento de la ovulación se manifiesta cuando la Cb. es administrada pocas horas antes de la misma (12hrs. antes del momento de la IATF en Rodríguez Barreto 2017) y no 24hrs. antes del momento de la IATF (en el presente trabajo), indicando que la Cb. podría interferir con el mecanismo ovulatorio más que con el crecimiento folicular, esta manifestación podría deberse por algún tipo de estrés pre-ovulatorio, inducido por los tratamientos y manejo.

La ausencia de efecto del tratamiento con Cb. o Dp. 30hrs. post-eCG sobre la penetrabilidad cervical no fue el resultado esperado pero, consideramos que el momento de aplicación de los tratamientos es clave para lograr mayor penetrabilidad cervical, pudiéndose hacer más estudios para ajustarlo. Las alternativas que podrían utilizarse son: administrar doble dosis de ambas o de una de las hormonas o realizar su administración separada. Por ejemplo, la Cb. antes y el Dp. después ya que, la Ox. estimula la liberación cervical de PGE2 (Schemesh y col., 1997; Fuchs y col., 2002), por lo que, la administración conjunta de análogos de Ox. y PGE2 podría provocar un efecto acumulativo de dos fuentes (endógena y exógena) de PGE2,. Otra alternativa es administrar primero Dp. y posteriormente Cb. dado que, se ha reportado que al menos en el miometrio, la respuesta a la Ox. es mayor luego de la administración de PGE2, sugiriendo que la PGE2 estimula la síntesis de receptores de Ox. por el músculo (Brummer, 1971). Estos datos sugieren que la administración de Ox. y PGE2 en un tratamiento combinado podría potenciar el efecto individual de cada hormona por separado.

CONCLUSIONES

Se concluye que, adelantar los tratamientos en el entorno que se realizó el ensayo experimental de inducción de la penetrabilidad cervical con Cb. o Dp. a las 30hrs. post-eCG, aparentemente no aumenta la penetrabilidad cervical al momento de la IATF, ni modifica el patrón temporal de la penetrabilidad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bajcsy AC, Szenci O, van der Weijden GC, Doornenbal A, Maassen F, Bartyik J, Taverne MAM. (2006). The effect of a single oxytocin or carbetocin treatment on uterine contractility in early postpartum dairy cows. *Theriogenology* 65: 400-414.
2. Brummer, Arnold Gillespie, T. Chard (1972). Oxytocin Release by Infused Prostaglandin *British Medical Journal*, 1: 543-544
3. Buckrell, B. (2000). *Reproductive Technologies Proceedings of the 6th Great Lakes Dairy Sheep Symposium, Guelph, Ontario, Canada. November 2000.* p. 77-93.
4. Campbell J.W., Harvey T.G., McDonald M.F. ,Sparksman R.I, (1996): Transcervical insemination in sheep: an anatomical and histological evaluation. *Theriog.* 45(8): 1535-1544.
5. Candappa IB, Bartlewski PM. (2012). A review of advances in artificial insemination (AI) and embryo transfer (ET) in sheep, with the special reference to hormonal induction of cervical dilation and its implications for controlled animal reproduction and surgical techniques. *Open ReprodSci* 3: 162-175.
6. Declaración Jurada Anual de Existencias DICOSE-SNIG 2017
7. Ellwood DA, Mitchell MD, Anderson AB, Turnbull AC. (1980). Specific changes in the in vitro production of prostanoids by the ovine cervix at parturition. *Prostaglandins* 19: 479-488.
8. Engstrøm T, Barth T, Melin P, Vilhardt H. (1998). Oxytocin receptor binding and uterotonic activity of carbetocin and its metabolites following enzymatic degradation. *Europ J Pharmacol* 355: 203-210.
9. Eppleston J, Salamon S, Moore NW, Evans G(1994). The depth of cervical insemination and site of intrauterine insemination and their relationship to the fertility of frozen-thawed ram semen. *AnimReprodSci* 1994;36:211–25.
10. Falchi L., Taema M., La Clanche S., Scaramuzzi R.J. (2012). The pattern of cervical penetration and the effect of topical treatment with prostaglandin and/or FSH and oxytocin on the depth of cervical

penetration in the ewe during the peri-ovulatory period. *Theriogenology* 78: 376–384.

11. Fuchs AR, Graddy LG, Kowalski AA, Fields MJ. (2002). Oxytocin induces PGE₂ release from bovine cervical mucosa in vivo. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 70: 119-129.
12. Gilbert CL¹, Jenkins K, Wathes DC. (1991). Pulsatile release of oxytocin into the circulation of the ewe during oestrus, mating and the early luteal phase. *J ReprodFertil* 91:337-346.
13. Goodman RL, Inskeep EK. (2006). Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the sheep. En: Neill JD. *Physiology of reproduction*. Ed. Elsevier. 3^a ed. St. Louis, p. 2389-2448.
14. Halbert,G.W., H.Dobson, J.S. Walton, B.C. Bucrell(1990). The structure of the cervical canal of de ewe. *Theriogenology*. 33(5):977-992.
15. Houdeau E, Raynal P, Marnet PG, Germain G, Mormède P, Rossano B, Monnerie R, Prud'homme MJ. (2002). Plasma levels of cortisol and oxytocin, and uterine activity after cervical artificial insemination in the ewe. *ReprodNutrDev* 42: 381-392.
16. Kershaw CM, Khalid M, McGowan MR, Ingram K, Leethongdee S, Wax G, Scaramuzzi RJ. (2005). The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology* 64:1225-1235.
17. King ME, McKelvey WA, Dingwall WS, Matthews KP, Gebbie FE, Mylne MJ, Stewart E, Robinson JJ. (2004). Lambing rates and litter sizes following intrauterine or cervical insemination of frozen/thawed semen with or without oxytocin administration. *Theriogenology* 62: 1236-1244.
18. Ledger WL, Ellwood DA, Taylor MJ. (1983). Cervical softening in late pregnant sheep by infusion of prostaglandin E-2 into a cervical artery. *J ReprodFertil* 69: 511-515.
19. Leethongdee S, Khalid M, Bhatti A, Ponglowhapan S, Kershaw CM, Scaramuzzi RJ. (2007). The effects of the prostaglandin E analogue Misoprostol and follicle-stimulating hormone on cervical penetrability in ewes during the peri-ovulatory period. *Theriogenology* 67: 767-777.

20. Leethongdee S, Kershaw-Young CM, Scaramuzzi RJ, Khalid M. (2010). Intra- cervical application of Misoprostol at estrus alters the content of cervical hyaluronan and the mRNA expression of follicle stimulating hormone receptor (FSHR), luteinizing hormone receptor (LHR) and cyclooxygenase-2 in the ewe. *Theriogenology* 73: 1257-1266.
21. Moré J. (1984). Anatomy and histology of the cervix uteri of the ewe: new insights. *Acta Anat.* 120:156-159.
22. Owiny JR, Fitzpatrick RJ. (1990). Effect of intravaginal application of prostaglandin E2 gel on the mechanical properties of the ovine cervix uteri at term. *Am J ObstetGynecol* 163: 657-660.
23. Robinson JJ, McKelvey WA, King ME, Mitchell SE, Mylne MJ, McEvoy TG, Dingwall WS, Williams LM. (2011). Traversing the ovine cervix - a challenge for cryopreserved semen and creative science. *Animal* 5: 1791-1804.
24. Rodríguez-Piñón M. (2003). Importancia del cervix ovino como barrera para la Inseminación Artificial. En: Ungerfeld R. *Reproducción de los Animales Domésticos*. Montevideo, Melibea, V 2, pp. 353-364.
25. Rodríguez-Piñón M. (2006). Receptores de las hormonas esteroideas sexuales en cervix ovino. Estudios en corderas pre-púberes y en ovejas adultas durante el ciclo estral natural e inducido. Tesis de Maestría. Facultad de Veterinaria, UdelaR, 50 p.
26. Rodríguez-Piñón M. (2015). Estudios endócrinos y moleculares en el Cervix ovino durante el Ciclo Estral y el Anestro Estacional. Tesis de Doctorado. Facultad de Veterinaria, UdelaR, 66 p.
27. Rodríguez y Barreto (2017). Efecto del tratamiento con oxitocina y/o prostaglandina E2 sobre la penetrabilidad cervical en ovejas Corriedale al momento de la inseminación artificial a tiempo fijo. Tesis de Grado, Facultad de Veterinaria, UdelaR, 21p. Montevideo, Uruguay.
28. Salamon S, Maxwell W. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62: 77-111.
29. Sayre BL, Lewis GS. (1996). Cervical dilation with exogenous oxytocin does not affect sperm movement into the oviducts in ewes. *Theriogenology* 45:1523-1533.

30. Sayre BL, Lewis GS. (1997). Fertility and ovum fertilization rate after laparoscopic or transcervical intrauterine artificial insemination of oxytocin-treated ewes. *Theriogenology* 48: 267-275.
31. Shemesh M, Dombrovski L, Gurevich M, Shore LS, Fuchs AR, Fields MJ. (1997). Regulation of bovine cervical secretion of prostaglandins and synthesis of cyclooxygenase by oxytocin. *ReprodFertilDev* 9: 525-530.
32. Stellflug JN, Wulster-Radcliffe MC, Hensley EL, Cowardin EA, Seals RC, Lewis GS. (2001). Oxytocin-induced cervical dilation and cervical manipulation in sheep: effects on laparoscopic artificial insemination. *J AnimSci* 79: 568-573.
33. Ungerfed, Rodolfo. (2002) *Reproducción de Animales Domésticos*. Tomo I Montevideo, Uruguay.
34. Wathes DC, Guldenaar SE, Swann RW, Webb R, Porter DG, Pickering BT. (1986). A combined radioimmunoassay and immunocytochemical study of ovarian oxytocin production during the periovulatory period in the ewe. *J ReprodFertil* 78: 167-183.
35. Wu WX, Coksaygan T, Chakrabarty K, Collins V, Rose JC and Nathanielsz PW. (2005). Sufficient progesterone-priming prior to estradiol stimulation is required for optimal induction of the cervical prostaglandin system in pregnant sheep at 0.7 gestations. *BiolReprod* 73: 343-350.
36. Wulster-Radcliffe MC, Lewis GS. (2002). Development of a new transcervical artificial insemination method for sheep: effects of a new transcervical artificial insemination catheter and traversing the cervix on semen quality and fertility. *Theriogenology* 58: 1361-1371.
37. Wulster-Radcliffe MC, Wang S, Lewis GS. (2004). Transcervical artificial insemination in sheep: effects of a new transcervical artificial insemination instrument and traversing the cervix on pregnancy and lambing rates. *Theriogenology* 62: 990-1002.
38. ZobelR, Taponen J. (2014). Denaverine hydrochloride and carbetocin increased welfare during and after parturition and enhanced subsequent fertility in cattle. *J DairySci* 97: 3570–3577.