



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados Académicos

**DILATACIÓN CERVICAL EN LA OVEJA: EFECTOS
DE TRATAMIENTOS CON ANÁLOGOS DE
OXITOCINA Y DE PROSTAGLANDINA E2 DE LARGA
ACCIÓN**

DANIELA CASURIAGA

**TESIS DE MAESTRÍA
EN REPRODUCCIÓN ANIMAL**

**URUGUAY
2019**



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados Académicos

**DILATACIÓN CERVICAL EN LA OVEJA: EFECTOS
DE TRATAMIENTOS CON ANÁLOGOS DE
OXITOCINA Y DE PROSTAGLANDINA E2 DE LARGA
ACCIÓN**

DANIELA CASURIAGA

Prof. Dr. Marcelo Rodríguez Piñón
Director de Tesis

Prof. Dra. Celia Tasende
Co-Directora de Tesis

2019

**INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE
DEFENSA DE TESIS**

FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS
DE MAESTRÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL

DILATACIÓN CERVICAL EN LA OVEJA: EFECTOS DE
TRATAMIENTOS CON ANÁLOGOS DE OXITOCINA Y DE
PROSTAGLANDINA E2 DE LARGA ACCIÓN

Por: Dra. Daniela Casuriaga Mallman
Director de Tesis: Dr. Marcelo Rodríguez Piñón
Codirectora de Tesis: Dra. Celia Tasende

Tribunal

Presidente: Dra. Raquel Pérez

Segundo Miembro: Dr. Jorge Gil

Tercer Miembro: Dra. Carolina Viñoles

Fallo del Tribunal:

[Handwritten signature of Raquel Pérez]
[Handwritten signature of Jorge Gil]
[Handwritten signature of Carolina Viñoles]
- APROBADA Con Mención -

Salón de Posgrados
Martes 25 de marzo de 2019

El Fallo de aprobación de la Tesis puede ser: Aprobada (corresponde a la nota BBB- en el Acta), o Aprobada con Mención (corresponde a la nota SSS- 12 en el Acta)

INFORME DEL TRIBUNAL

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fue realizada en el Área Bioquímica, Departamento de Biología Molecular y Celular, el experimento fue realizado en el campo experimental No 2, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. La financiación se obtuvo de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) y del Programa de Posgrados Académicos de Facultad de Veterinaria, agradezco a estas instituciones la posibilidad de realizar este trabajo.

Además, quisiera agradecer a las siguientes personas, que sin su ayuda este trabajo no hubiera sido posible:

A Marcelo y a Celia, director y codirectora de esta tesis, respectivamente, por guiar mis primeros pasos en el mundo de la ciencia y mostrarme que podía hacer de esto un modo de vida. Además, quisiera agradecer a Marcelo por la confianza y la paciencia, por darme independencia en el trabajo y permitirme crear. A Celia, por la gran dedicación, por recibirme en su casa (estando ya jubilada) con esas meriendas gloriosas mientras analizábamos los datos y entretejíamos las primeras líneas de la discusión. Por enseñarme la rigurosidad del método científico, pero sobre todo por mostrarme que el amor y la dedicación son la clave del éxito.

A mi querida amiga Aline, por su inmensa generosidad y bondad, por ayudarme en la redacción de esta tesis con mucha paciencia, creatividad y optimismo. Compañera en las buenas y en las malas.

A Gonzalo, mi querido compañero de muchas horas de laboratorio con todos los aciertos y desaciertos que caracterizan a ese trabajo, por tu gran disposición para ayudar.

A Rodolfo Ungerfeld, por ayudarme con el análisis estadístico de la tesis con toda la generosidad y la paciencia que caracterizan a un gran profesor.

A Juan Pablo, por acercarse a la discusión estadística de los datos con mucha disposición y cariño.

A Valentina, Cecilia e Inés por la amistad y el compañerismo.

A Perla, por todo el cariño que nos das, por hacerme sentir como en casa desde el inicio.

A los estudiantes y docentes de la Facultad de Veterinaria que contribuyeron para que estos experimentos pudiesen llevarse a cabo con compromiso y responsabilidad: Luisina Gonnet, Nadia Larrosa, Jessica Rodríguez, Andrea Barreto, Leandro Pombo, Mario Jauregui, Rafael Duca, Florencia Cousté, Pilar Orticochea, Nicolás Iwanka, Alice Fernández (estudiantes), Celia Tasende, Marcelo Rodríguez-Piñón, Danilo Fila, Rafael Aragunde, Alejandro Bielli, Patricia Genovese, Aline Freitas de Melo, Juan Pablo Damián, Valentina Ocampo, Cecilia López, Oscar Correa (docentes). Especialmente quisiera agradecer a Danilo Fila y Rafael Aragunde que con mucho entusiasmo y profesionalismo realizaron las ecografías de este experimento y a Alejandro Bielli, Patricia Genovese, Celia Tasende y Marcelo Rodríguez-Piñón que

me ayudaron en la disección del tejido y el procesamiento de las muestras colectadas en el experimento.

A Papá, quien me enseñó la importancia de la dedicación y del trabajo. Incansable luchador, alegre y soñador que contagia ganas de vivir.

A minha mãe, que estuvo dispuesta a cambiar su vida por la esperanza de un futuro mejor, ejemplo de amor y apoyo constante.

A mi hermana, que me inspiró a encontrar la paz en lo que hago y a Clarita, que me enseña a mirar el mundo con ojos de niño y me incita a luchar por mejorarlo.

A Alicia, gran madre, mujer inteligente y bondadosa que contagia alegría y simplicidad. Muchas gracias por tu apoyo a lo largo de mi carrera.

A mis amigas, las de toda la vida y las de ahora, las de siempre y las de a veces, a ellas les agradezco las risas y las charlas que hicieron este camino más ameno.

A Fernando, mi compañero de vida, por todo el apoyo y el amor incondicional. Por la paciencia y por brindarme el remanso donde encontrar la paz. A ti te dedico esta tesis.

ÍNDICE

	Páginas
Agradecimientos	i
Índice	iii
Índice de figuras	iv
Glosario de abreviaturas	v
Resumen	vi
Summary	viii
1. Introducción	01
1.1. Fisiología y manejo reproductivo en ovinos	01
1.1.1 Ciclo estral	01
1.1.2 Inseminación artificial (IA)	02
1.2 La anatomía del cérvix como limitante de la IA en la oveja	02
1.3 Estrategias para incrementar la profundidad de deposición seminal a través del cérvix	04
1.3.1 Métodos físicos para dilatar el cérvix	04
1.3.2 Inducción hormonal de la dilatación cervical	05
1.3.2.1. Oxitocina	05
1.3.2.2. Prostaglandinas E (PGE).	06
1.4 Mecanismos de dilatación cervical	07
1.4.1 Degradación del colágeno cervical y metaloproteinasas de la matriz extracelular	10
2. Hipótesis y Objetivo Generales y específicos	13
2.1 Hipótesis general	13
2.2. Objetivo general	13
2.3 Objetivos específicos	13
3. Estrategia Experimental	14
Estrategia general	14
4. Materiales y métodos	16
5. Resultados	21
6. Discusión	27
7. Conclusiones	31
8. Bibliografía	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación morfológica del cérvix de ovejas adultas según el grado de complejidad estructural y su relación con la profundidad de penetración cervical.....	03
Figura 2: Efecto de la profundidad de deposición seminal sobre el % de parición en ovejas inseminadas por vía transcervical con semen congelado	04
Figura 3: Pasos de la síntesis de PGE2 y su regulación por estradiol y oxitocina en el cérvix de la oveja durante el estro.....	08
Figura 4: Diagrama del mecanismo de dilatación cervical propuesto para la oveja durante el estro y su regulación por los estrógenos (17 β estradiol), oxitocina y PGE2.....	10
Figura 5. Intervalo eCG- ovulación de ovejas Corriedale sincronizadas con esponjas de medroxiprogesterona intravaginal por 13 días seguida de la aplicación de eCG al retirar las esponjas.....	21
Figura 6. Penetrabilidad cervical a las 0, 42 y 54 h post eCG en ovejas sincronizadas con medroxiprogesterona intravaginal por 13 días seguida de la aplicación de eCG y tratadas a las 42 h post eCG con análogos de oxitocina y PGE2 de larga acción.....	22
Figura 7. Actividad de la MMP-2 en ovejas sincronizadas con medroxiprogesterona intravaginal por 13 días seguida de la aplicación de eCG y tratadas a las 42 h post eCG con análogos de oxitocina y PGE2 de larga acción.....	26

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ANOVA: Análisis de Varianza

COX-1: ciclooxigenasa- 1

COX-2: ciclooxigenasa- 2

eCG: gonadotrofina coriónica equina

EP: receptor de PGE2

GnRH: hormona liberadora de gonadotrofinas

IA: inseminación artificial

IATF: inseminación artificial a tiempo fijo

LH: hormona luteinizante

MAP: acetato de medroxiprogesterona

MMP: metaloproteinasa de la matriz extracelular

Ox: oxitocina

OxL: oxitocina de larga acción

PGE: prostaglandina E

PGEL: prostaglandina E de liberación lenta

ROX: receptor de Ox

SAS: Statistical Analysis Systems SAS Institute.

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio

RESUMEN

El objetivo de esta Tesis fue determinar si la administración sola o combinada de análogos de oxitocina y prostaglandina E2 de larga acción (OxL y PGE2L) antes del momento esperado de la inseminación artificial (IA) aumenta la penetrabilidad y la degradación del colágeno cervical en ovejas. Para ello se sincronizó la ovulación de 40 ovejas Corriedale multíparas a través de la administración intravaginal de una esponja impregnada con 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP, Syntex, Buenos Aires, Argentina) por 13 días y la administración de 300 UI de gonadotrofina coriónica equina (eCG) i.m. (Novormon 5000®, Syntex, Buenos Aires, Argentina) al momento de retirar las esponjas (0 h). Las ovejas fueron adjudicadas a cuatro grupos experimentales de 10 animales cada uno, homogéneos de acuerdo a su peso corporal. A las 42 h post eCG (12 h antes del momento esperado de la IATF), cada grupo fue asignado de manera aleatoria a uno de cuatro tratamientos en un arreglo factorial 2x2. Los tratamientos fueron: grupo OxL, las ovejas recibieron 2 mL (40µg) i.m. de Carbetocina (Decomotón, Laboratorios Callier, Uruguay) y un dispositivo intravaginal placebo; grupo PGE2L, las ovejas recibieron 10 mg de Dinoprostone en un dispositivo intravaginal de liberación lenta (Cervidil, Propess®, Ferring Pharmaceuticals Ltd., West Drayton, UK) y 2 mL i.m. de solución salina; grupo OxL+PGE2L, las ovejas recibieron ambas hormonas administradas en simultáneo y de igual forma que lo descrito previamente para los grupos OxL y PGE2L y grupo Control las ovejas recibieron 2 mL de solución salina i.m. y un dispositivo intravaginal placebo. La penetrabilidad cervical se midió a las 0, 42 y 54 h post eCG, en todos los animales. Al momento esperado de la IA (54 h post eCG), se eligieron al azar la mitad de los animales de cada grupo y se sacrificaron para la obtención del cérvix. La determinación del contenido de colágeno y de la actividad gelatinolítica de las formas activada y latente de las metaloproteinasas de la matriz extracelular -2 y -9 (MMP-2 y MMP-9, respectivamente) se realizó por espectrofotometría y zimografía en gel de poliacrilamida co-polimerizado con gelatina, respectivamente, en muestras de cérvix craneal y caudal previamente homogenizadas. Para conocer el momento de la ovulación, se realizaron ecografías seriadas de ambos ovarios por vía transrectal a las 12, 20, 28, 36, 42, 48 y 54 h post eCG. Treinta y cuatro de los cuarenta animales ovularon antes de la administración de los tratamientos con PGE2L y/o OxL (42 h post eCG). Los seis animales que ovularon luego de los tratamientos fueron eliminados de los análisis estadísticos de todas las variables estudiadas en esta tesis. Para el análisis de los datos se utilizó un Análisis de Varianza 2x2 (ANOVA) de SAS (Statistical Analysis Systems SAS Institute, 2000; Carolina del Norte, EUA). El Log (n+1) de la penetrabilidad cervical fue afectada por la h post eCG ($P < 0,0001$, $n=34$) y por la interacción entre los tratamientos y la h post eCG ($P=0,03$, $n=34$). En todos los grupos experimentales la penetrabilidad cervical aumentó desde la administración de la eCG (0 h post eCG) hasta el momento de la administración de los tratamientos experimentales (42 h post eCG) ($P < 0,0029$), sin diferencias entre grupos. Desde la administración de los tratamientos hasta el momento esperado de la IATF (54 h post eCG) se detectó una disminución de la penetrabilidad cervical en el grupo Control ($P= 0,0207$) que no fue detectada en los grupos tratados. A las 54 h post eCG, la penetrabilidad cervical fue mayor en todos los grupos tratados comparada con el Control a la misma hora, sin diferencias entre ellos ($P < 0,0373$). La concentración del colágeno cervical (mg/g de tejido seco) fue afectada por el tratamiento con PGE2L ($n= 17$; $P= 0,03$) y la interacción del tratamiento con OxL y PGE2L ($n=17$;

P=0,002). Además, se detectó una interacción del tratamiento con OxL y PGE2L y la zona cervical (n= 17; P=0,04). En la zona caudal la concentración del colágeno fue menor en el grupo OxL comparada con el grupo Control (P=0,006) y con el grupo OxL+PGE2L (P= 0,002). La concentración del colágeno en el grupo PGE2L fue menor con respecto al grupo OxL+PGE2L (P=0,019) y tendió a ser menor con respecto al grupo Control (P=0,062). La actividad de la forma activada de la MMP-2 fue afectada por el tratamiento con OxL (P=0,04, n=17), pero no por el tratamiento con PGE2L u OxL+PGE2L. La actividad de la forma activada de la MMP-2 (ng/mg de proteínas) fue mayor en los animales tratados con OxL con respecto a los animales no tratados con OxL (incluyen los grupos Control y PGE2L) (n=17; P=0,04,). En conclusión la administración de OxL, PGE2L y su combinación en ovejas Corriedale prolongó en el tiempo el incremento de la penetrabilidad cervical generada en respuesta al tratamiento con MAP y eCG, específicamente en el período comprendido entre las 42 y las 54 h post eCG. Como resultado, al momento esperado de la IATF (54 h post eCG), todos los animales tratados tuvieron mayor penetrabilidad cervical que los animales controles, sin presentar diferencias entre sí. Los efectos de la OxL sobre la penetrabilidad cervical podrían explicarse en parte por un aumento de la degradación del colágeno mediada por la MMP-2, mientras que la PGE2 actuaría fundamentalmente a través de un mecanismo diferente a la degradación del colágeno.

SUMMARY

The aim of this research was to study the effectiveness of the administration of oxytocin and/or prostaglandin E2 long-acting analogs (OxL and/or PGE2L) before the expected time of artificial insemination (IA) in order to increase the cervical penetrability and collagen degradation in the cervix of the ewe. The ovulation of 40 Corriedale ewes was synchronized using 60 mg of medroxyprogesterone acetate (MAP) administrated in an intravaginal sponge (Syntex, Buenos Aires, Argentina) for 13 days and an intramuscular injection of 300 IU of equine chorionic gonadotropin (eCG) at the time of sponges removal. At 42 h post eCG (12 hours before the expected time of AI), ewes were assigned to four groups of 10 animals each one according to body weight. Each group was randomly assigned to one of four treatments in a 2x2 factorial arrangement. The treated groups were: OxL, ewes received 2 mL (40 µg) of Carbetocin i.m (Decomotón, Laboratorios Callier, Uruguay) and a placebo intravaginal device; PGE2L, ewes received 10 mg of Dinoprostone in a slow release intravaginal device (Propess®, Ferring Pharmaceuticals Ltd., West Drayton, UK) and 2 mL of saline solution i.m; OxL and PGE2L, ewes received the administration of both hormones simultaneously and in the same way as was previously described for OxL and PGE2L and Control, ewes received a 2 mL of saline solution i.m and a placebo intravaginal device. Cervical penetrability was measured at 0, 42 y 54 h post eCG in all the animals. At the expected time of AI (54 h post eCG) half of the animals from each group were randomly selected and sacrificed to collect the cervix. Collagen content and gelatinolytic activity of the activated and latent forms of the matrix metalloproteinase-2 y -9 (MMP-2 and MMP-9, respectively) was performed by spectrophotometry and polyacrylamide gel zymography co-polymerized with gelatin, respectively, in samples of cranial and caudal cervix previously homogenized. In order to achieve the time of the ovulation, serial ultrasounds of both ovaries were performed transrectally at 12, 20, 28, 36, 42, 48 and 54 h post eCG. Thirty-four (34/40) ewes ovulated before administration of the OxL and/or PGE2L treatments (42 h post eCG). The six ewes that ovulated after the administration of OxL and/or PGE2L (6/40) were eliminated from this study. The analysis of the data was performed using SAS (Statistical Analysis Systems SAS Institute, 2000, North Carolina, USA) 2x2 Analysis of Variance (ANOVA). Cervical penetrability (Log (n + 1), was affected by the h post eCG ($P < 0.0001$, $n = 34$) and by the interaction of the treatments and the h post eCG ($P = 0.03$, $n = 34$). In all the experimental groups, the cervical penetrability increased from the time of the administration of eCG (0 h post eCG) until the time of the administration of OxL and/or PGE2L (42 h post eCG) ($P < 0.0029$), without differences between groups. A decrease in cervical penetrability was detected in the Control group ($P = 0.0207$) between the time of treatment administration (42 h post eCG) and the expected time of the IATF (54 h post eCG), which was not detected in the treated groups. At 54 h post eCG, cervical penetrability was higher in all treated groups than Control group at the same time ($P < 0.0373$), without differences between them. The concentration of cervical collagen (mg / g of dry tissue) was affected by the treatment with PGE2L ($n = 17$, $P = 0.03$) and the interaction of the treatment with OxL and PGE2L ($n = 17$, $P = 0.002$). In addition, we detected an interaction of the treatment with OxL and PGE2L and cervical zone ($n = 17$, $P = 0.04$). In the caudal cervix, the collagen concentration was lower in the OxL group compared with Control ($P = 0.006$) and OxL + PGE2L group ($P = 0.002$). The collagen concentration was lower in the PGE2L group compared

with the OxL + PGE2L group ($P = 0.019$) and tended to be lower compared with Control group ($P = 0.062$). The activity of the activated form of MMP-2 was affected by treatment with OxL ($P = 0.04$, $n = 17$), but not by treatment with PGE2L or OxL + PGE2L. The activity of the activated form of MMP-2 (ng / mg of proteins) was greater in the animals treated with OxL than in the animals not treated with OxL (including the controls and animals treated only with PGE2L) ($n = 17$; $P = 0.04$,). In conclusion, the administration of OxL, PGE2L and its combination in Corriedale ewes prolonged the MAP-eCG-induced cervical penetrability increase until 54 h post eCG. As a result, at the expected time of the IATF (54 h post eCG), cervical penetrability was higher in all the treated groups than the control group. The effects of OxL on cervical penetrability could be explained in part by an increase in collagen degradation mediated by MMP-2 while PGE2 would act through a different mechanism from collagen degradation.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Fisiología y manejo reproductivo en ovinos

1.1.1 Ciclo estral

Las ovejas de razas originarias de zonas de latitudes altas o intermedias como las de Uruguay, tienen un patrón reproductivo poliéstrico estacional. La estación reproductiva ocurre al final del verano y durante el otoño, y el anestro estacional se extiende desde el invierno hasta el inicio del verano (Rawlings y Bartlewski, 2007). Durante la estación reproductiva las ovejas presentan el ciclo estral con un intervalo promedio de 17 días (Goodman y Inskeep, 2006).

El ciclo estral de las ovejas puede dividirse en fase folicular y luteal. La fase folicular se extiende desde la regresión del cuerpo lúteo (luteólisis), que ocurre al día 13-14 del ciclo (celo= día 0) hasta el día 2. Durante la fase folicular, la caída de los niveles circulantes de progesterona, producto de la luteólisis, desencadena un aumento de la frecuencia de la pulsatilidad de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) hipotalámica que a su vez estimula un aumento de la frecuencia de los pulsos de la hormona luteinizante (LH) hipofisiaria (revisión: Thiery y Martin, 1991). Ante el aumento de la pulsatilidad de la LH, los folículos antrales responden secretando estrógenos, creándose una retroalimentación positiva GnRH-LH-estrógenos. Por lo tanto, la fase folicular está caracterizada por un predominio de los estrógenos sobre la progesterona (Senger, 1999). El aumento en la relación estrógenos/progesterona durante esta fase es importante para la manifestación de celo. El celo tiene una duración aproximada de 22 h y es el período en que las concentraciones séricas de estrógenos son máximas y las de progesterona basales (Goodman y Inskeep, 2006). El mecanismo de retroalimentación positiva GnRH-LH-estrógenos culmina en la producción del pico preovulatorio de estrógenos, la descarga masiva de LH (pico de LH) y la ovulación del o los folículos dominantes que ocurre al final del estro (Scaramuzzi y col., 1993). Luego de la ovulación, ocurre la luteinización de la estructura folicular remanente dando inicio a la fase luteal.

La fase luteal se extiende desde el día 2-3 del ciclo hasta el día 13-14. Esta fase está caracterizada por el desarrollo del cuerpo lúteo que produce progesterona (Skarzynski y col., 2008) y por lo tanto por el aumento paulatino de las concentraciones circulantes de progesterona, que aumentan más de 10 veces con respecto a la fase folicular (Senger, 1999). En el caso de no producirse la gestación, entre el día 12 - 13 del ciclo estral la capacidad de cuerpo lúteo de sintetizar y secretar progesterona comienza a disminuir debido a la ocurrencia de la luteólisis (Juengel y col., 1993; Meidan y col., 1999). La prostaglandina F2 α es la principal hormona luteolítica y es liberada por el útero al final de la fase luteal (Stouffer, 2006). El primer estímulo para la secreción de prostaglandina F2 α por el útero es la oxitocina (Ox) secretada por la hipófisis, y luego la Ox comienza a ser secretada por el propio cuerpo lúteo. La Ox es secretada en forma de pulsos que disminuyen en amplitud desde la luteólisis al pico preovulatorio de LH (Wathes y col., 1986; Gilbert y col., 1991). Cada pulso de Ox de origen luteal estimula un pulso de prostaglandina F2 α por el útero, dando lugar a un mecanismo de retroalimentación positiva Ox luteal- prostaglandina F2 α uterina que culmina con la pérdida total de la actividad del cuerpo lúteo (McCracken y col., 1999). Al inicio de la fase luteal, este

mecanismo se mantiene inhibido por la progesterona secretada por el cuerpo lúteo que inhibe las síntesis de receptores de Ox en el útero. Posteriormente, la pérdida del efecto inhibitor de la progesterona y el aumento de los estrógenos por el folículo en crecimiento estimulan el incremento de los receptores de Ox en el útero (Flint y Sheldrick, 1986) desencadenando la luteólisis y el inicio de un nuevo ciclo (Zarco y col., 1988; Flint y col., 1990).

1.1.2 Inseminación artificial (IA)

La IA es una herramienta sencilla, ampliamente utilizada en la industria ganadera para incrementar la mejora genética, ya que permite aumentar la eficiencia reproductiva del macho genéticamente mejorado (Candappa y Bartlewski, 2011). Además, las técnicas de congelamiento del semen han permitido la conservación del mismo por períodos prolongados de tiempo facilitando su transporte (Gil y col., 2003). La utilización de protocolos hormonales de sincronización de la ovulación asociados a la IA ha dado lugar a la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF), en la cual no es necesaria la detección del celo. La implementación de esta tecnología permite además concentrar los partos, lo que optimiza aún más el uso del recurso humano y contribuye al manejo nutricional de la majada (Fierro y col., 2009). En la oveja, los tratamientos de sincronización de la ovulación más utilizados para la IATF consisten en la administración intravaginal de progestágenos por 7 a 14 días, seguida inmediatamente por la administración de gonadotrofina coriónica equina (eCG) (Menchaca y Rubianes, 2004; Viñoles y col., 2001; Dos Santos-Neto y col., 2015). Con estos tratamientos la ovulación ocurre aproximadamente a las 60 h de la administración de la eCG y el momento óptimo para la IA es entre las 48 a 60 h (Menchaca y Rubianes, 2004; Olivera-Muzante y col. 2011; Abecia y col. 2012; Dos Santos Neto y col. 2015; Menchaca, 2016).

A pesar de las ventajas que ofrece la IA, la mayoría de las ovejas del Uruguay son servidas por monta natural durante la estación reproductiva y solo un 8,5 % de los servicios son realizados por IA, de los cuales poco menos de un tercio son por IATF (Censo General Agropecuario, 2011; Olivera-Muzante y Fierro, 2016). La escasa adopción de esta biotecnología por los productores criadores de ovinos se debe, en parte, a la compleja anatomía del cérvix de la oveja que limita el pasaje transcervical de la cánula de inseminar (Halbert y col., 1990b).

1.2 La anatomía del cérvix como limitante de la IA en la oveja

El cérvix de la oveja es un órgano de 4 a 10 cm de longitud, caracterizado por la presencia de 4-7 anillos que ocluyen la luz del órgano (Fukui y Roberts, 1978). A lo largo del eje longitudinal del cérvix se pueden distinguir dos zonas que difieren desde el punto de vista anatómico: la zona cervical caudal, contigua a la vagina que se extiende desde el orificio cervical externo hasta el tercer o cuarto anillo y la zona cervical craneal que se ubica desde el final del cérvix caudal hasta el inicio del útero (Moré, 1984; Halbert y col., 1990b). La zona cervical caudal es considerada la de mayor estrechamiento del cérvix, en esta zona se encuentra el segundo anillo cervical, caracterizado por un gran desarrollo y por estar desalineado con respecto al primero. Esta morfología, implica la existencia de espacios ciegos que dificultan la canulación al momento de inseminar (Fukui y Roberts, 1978) y aumentan el riesgo de daño cervical (Halbert y col., 1990b). En contraposición, la zona cervical craneal

se caracteriza por presentar anillos pequeños y alineados (Kershaw y col., 2005). La morfología del cérvix varía entre razas (Kaabi y col., 2006) y también entre individuos de una misma raza (Naqvi y col., 2005; Kershaw y col., 2005), lo que resulta en diferentes grados de profundidad de penetración cervical entre animales (Kershaw y col., 2005). En la Figura 1 se presenta diferentes tipos de cervices según sus características anatómicas y su relación con la profundidad de penetración cervical. En la mayoría de los casos, el depósito del semen durante la IA transcervical en la oveja es realizado a nivel vaginal o en la parte más caudal del cérvix (Candappa y Bartlewski, 2011).

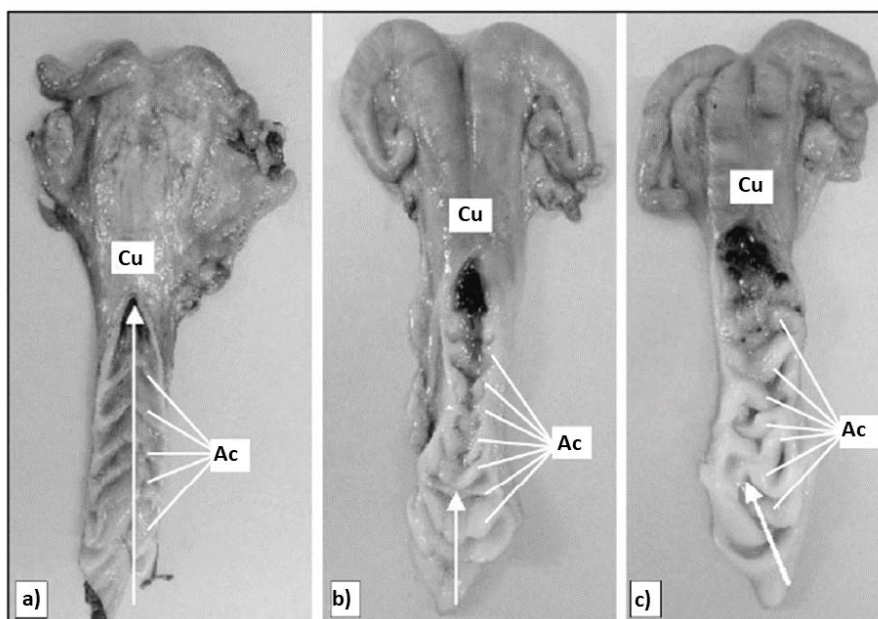


Figura 1: Clasificación morfológica del cérvix de ovejas adultas según el grado de complejidad estructural y su relación con la profundidad de penetración cervical: a) grado 1, cervices con anillos cervicales (Ac) completos y alineados entre sí; b) grado 2, cervices con algunos anillos completos y alineados entre sí (como los de grado 1) y con anillos incompletos y desalineados; c) grado 3, cervices con mayoritariamente anillos incompletos y desalineados. Las flechas indican la dirección y el máximo de profundidad cervical que se puede alcanzar de acuerdo al grado de complejidad de la anatomía del cérvix (Kershaw y col., 2005, modificado por Candappa y Bartlewski, 2011).

La deposición del semen en la vagina o cérvix caudal favorece la pérdida retrógrada del mismo a partir del tracto reproductivo, disminuyendo la cantidad de espermatozoides disponibles para fertilizar al ovocito. Para evitar que esta pérdida retrógrada de semen afecte la fertilidad se aumenta la dosis inseminante lo que disminuye la eficiencia de la IA. Las tasas de preñez alcanzadas luego de la IATF vía vaginal o intracervical caudal pueden variar de 40 a 50% con semen fresco, siendo menor en el caso del semen congelado (Menchaca, 2016). Se ha observado que la fertilidad aumenta proporcionalmente con la profundidad en que se realiza la deposición seminal en el canal cervical (Eppleston y col., 1994). En la figura 2 se presenta el efecto de la profundidad de deposición seminal sobre el porcentaje (%) de parición en ovejas inseminadas por vía transcervical con semen congelado (Salamon y Maxwell, 2000).

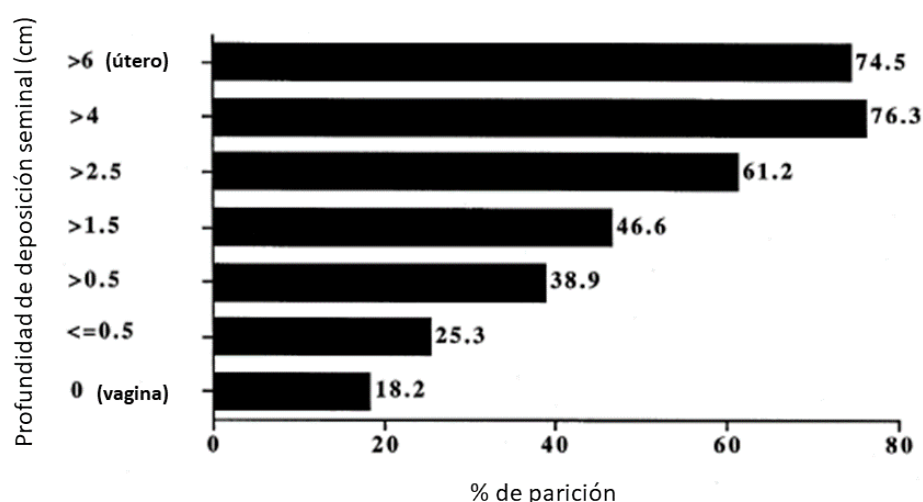


Figura 2: Efecto de la profundidad de deposición seminal sobre el porcentaje (%) de parición en ovejas inseminadas por vía transcervical con semen congelado (promedios de % de parición extraído de 26 publicaciones, 9716 ovejas, revisado en Salamon y Maxwell, 2000).

Con el objetivo de obtener una mejor tasa de preñez, se realiza la deposición del semen en el útero por laparoscopia (Killen y col., 1982). La tasa de preñez con inseminación intrauterina por laparoscopia a tiempo fijo varía de 65 a 70 % con semen fresco y de 45 a 55 % con semen congelado (Menchaca, 2016). Sin embargo, esta técnica requiere formación técnica, la utilización de materiales y equipos específicos y personal entrenado para su implementación. Además, aunque sea una técnica considerada moderadamente invasiva, su uso repetido afecta negativamente el bienestar de los animales (Candappa y Bartlewski, 2011). Estas observaciones destacan la importancia de desarrollar prácticas que permitan incrementar la profundidad de deposición seminal a través del cérvix, contribuyendo al desarrollo de un método eficiente de la IA transcervical en la oveja como una alternativa al uso de la laparoscopia.

1.3 Estrategias para incrementar la profundidad de deposición seminal a través del cérvix

1.3.1 Métodos físicos para dilatar el cérvix

En la oveja se han estudiado diferentes estrategias para incrementar la profundidad de deposición seminal a través del cérvix. Halbert y col., 1990, 1990a evaluaron diferentes métodos de contención, espéculos, fórceps y cánulas de inseminar para su utilización en la IA transcervical. A partir de este trabajo, se diseñó una técnica de IA transcervical conocida como Guelph System que consiste en posicionar a la oveja en decúbito dorsal, conteniéndola en un dispositivo usualmente utilizado para despezuñar. Luego de posicionada la oveja, con la ayuda de un espéculo con luz se realiza la retracción del tejido que rodea al orificio cervical externo por medio de fórceps y se realiza la canulación con la cánula descrita por Buckrell y col. (1994) (Halbert y col., 1990, 1990a) A modo de referencia, se observó que las tasas de preñez alcanzadas con este método fueron 60 a 80% con el uso de semen fresco y 40

a 70% con el uso de semen congelado depositado a nivel intrauterino (Buckrell y col., 1994). Sin embargo, se observó que factores tales como la edad, número de pariciones, raza y variaciones individuales entre las ovejas contribuyeron a una gran variabilidad en la respuesta obtenida (Windsor, 1995; Kaabi y col., 2006). Además, se detectaron lesiones cervicales asociadas a la tracción del cérvix y su canulación que podrían afectar negativamente el desempeño reproductivo y el bienestar de los animales (Campbell y col., 1996).

Más recientemente, Fonseca y col., 2013, 2016 desarrollaron una técnica para la colecta de embriones que ha facilitado el acceso al útero en ovejas. La técnica se realiza con el animal parado, implica el uso de sedación leve y analgesia y consiste en la exteriorización del cérvix a través de la vagina aplicando movimientos suaves de tracción. De esta forma, el cérvix puede ser manipulado completamente a través de la vagina durante la canulación. La asociación de la técnica diseñada por Fonseca y col., 2016 al uso de estradiol, prostaglandina F₂ alfa y Ox administrados antes de la colecta de embriones (Protocolo Embrapa para la dilatación cervical en la oveja) ha permitido el acceso al útero y la colecta exitosa de embriones en el 80-90% de las ovejas de raza Santa Ines, Morada Nova y Lacaune (Fonseca y col., 2018, 2019). Además, esta técnica ha sido utilizada para la IATF transcervical en ovejas Corriedale, observándose que las tasas de preñez obtenidas utilizando semen fresco fueron similares a las detectadas mediante laparoscopia pero solo cuando el semen pudo ser depositado a más de 4 cm de profundidad en el cérvix, lo que se alcanzó en menos del 30% de las ovejas (Casali y col., 2017). En este mismo trabajo se observó que menos del 10% de las ovejas pudieron ser canuladas hasta el útero por lo que los autores sugirieron que la efectividad de la técnica descrita por Fonseca y col., 2016 podría ser baja en ovejas de raza Corriedale. Además de estas técnicas, se han modificado y diseñado diferentes cánulas de inseminar basadas en la anatomía del cérvix ovino (Wulster-Radcliffe y Lewis, 2002; Wulster-Radcliffe y Lewis, 2004; Leethongdee y col., 2007; Álvarez y col., 2012). Sin embargo, hasta el momento no se ha logrado validar un método eficiente de IA transcervical en la oveja.

1.3.2 Inducción hormonal de la dilatación cervical

Con el objetivo de aumentar la penetrabilidad cervical en la oveja se ha estudiado también el efecto de la aplicación de diferentes hormonas sobre la dilatación cervical como: 17 β estradiol (Wulster-Radcliffe y col., 1999), Ox (Khalifa y col., 1992; Sayre y Lewis, 1997; Stellflug y col., 2001; King y col., 2004), prostaglandina E (PGE) (Leethongdee y col., 2007; Candappa y col., 2009), relaxina (Salamon y Lightfoot, 1967). Algunos trabajos han demostrado que la administración de Ox (Khalifa y col., 1992) y PGE previo a la IA (Leethongdee y col., 2007; Candappa y col., 2009; Candappa y Bartleski, 2014) ha facilitado la canulación cervical.

1.3.2.1 Oxitocina

La administración i.v de Ox inmediatamente antes de la IA permitió el acceso al útero en 77 a 100% de los animales tratados (Khalifa y col., 1992; Sayre y Lewis, 1996). Contrariamente, la administración i.m de Ox antes de la IA no permitió el acceso al útero en ninguno de los animales tratados (King y col., 2004). Esto muestra que los resultados obtenidos con el uso de la Ox en la dilatación cervical en la oveja son aún inconsistentes. Además, se ha reportado, que la utilización Ox administrada

i.v o i.m previo a la IA disminuye las tasas de preñez y de parición en ovejas (Stellflug y col., 2001; King y col., 2004). Esta disminución de la fertilidad en respuesta a la Ox es mayor con la IA transcervical en comparación con IA por laparoscopia (King y col., 2004). Esto sugiere que los efectos adversos de la Ox sobre la fertilidad se amplifican con la manipulación del cérvix durante la IA transcervical. Se ha reportado que la administración suprafisiológica de Ox aumenta la contractibilidad uterina (Houdeau y col., 2002; Sayre y Lewis, 1996), lo que podría afectar el transporte normal de los espermatozoides a través del útero luego de la IA y generar menores tasas de fertilidad (Lightfoot, 1970). Para evitar estos efectos, King y col. (2004) destacan la importancia de mantener niveles de Ox similares a los fisiológicos. Estos autores sugirieron que la administración repetida de pequeñas dosis de Ox que simulen el patrón fisiológico de liberación de Ox durante el estro, podría mejorar la fertilidad (Wathes et al. 1986; Gilbert y col., 1991). Sin embargo, la administración repetida de pequeñas dosis de Ox sería de difícil aplicación en majadas numerosas. Alternativamente, sería interesante estudiar el uso de la Ox en presentaciones de larga acción para evitar afectar negativamente la fertilidad.

La Carbetocina es un análogo sintético de la Ox de larga acción (OxL) ya que tiene una vida media que es 4 a 10 veces más prolongada que la Ox natural (Fabián y col., 1969; Sweeney y col., 1990). La vida media más prolongada de la Carbetocina es el resultado de modificaciones en su estructura que protege la molécula de Carbetocina de la metabolización enzimática, aumentando su estabilidad (Meshykhi y Lucas, 2016). A pesar de las diferencias estructurales existentes entre la Ox y la Carbetocina, se ha reportado que ambas moléculas poseen la misma afinidad por el receptor de Ox, induciendo su activación a través del mismo segundo mensajero (Engstrøm y col., 1998). La acción prolongada de la Carbetocina en comparación con la Ox permitiría evitar el uso de dosis repetidas o supra fisiológicas (Atke and Vilhardt, 1987; Rath, 2009). Además, se ha reportado que la Carbetocina posee una menor actividad uterotónica que la Ox (Atke and Vilhardt., 1987; Engstrøm y col., 1998), por lo que la administración de Carbetocina podría disminuir el efecto negativo de la Ox sobre la fertilidad. Por lo tanto, la Carbetocina podría ser una alternativa al uso de la Ox en la inducción de la dilatación cervical en ovejas durante el estro. En vacas al parto, su administración en combinación con un antiespasmódico (Denaverina) estimuló la dilatación cervical (Zobel y col., 2014). Sin embargo todavía no se ha estudiado el uso de la Carbetocina para la dilatación cervical en ovejas

1.3.2.2 Prostaglandinas E (PGE)

Existen pocos reportes sobre la utilización de PGE en la inducción hormonal de la dilatación cervical en ovejas. Mayoritariamente los trabajos indican que la utilización intravaginal de análogos de PGE1 (Misoprostol) y de PGE2 (Dinoprostone) de larga acción facilitan la canulación cervical en la oveja cuando son administradas antes de la IA o de la transferencia de embriones (Leethongdee y col., 2007; Candappa y col., 2009; Bartlewski y Candappa, 2015). El Dinoprostone es un análogo de PGE2 contenido en un dispositivo intravaginal de liberación lenta (PGE2L). Los trabajos que evaluaron la utilización del Dinoprostone para dilatar el cérvix en ovejas, lo hicieron combinándolo con la técnica de IA transcervical “Guelph System” y son los que se comentan a continuación. En ovejas en anestro inducidas a ovular, la administración intravaginal de Dinoprostone 12 h antes de la IATF, aumento el

número de ovejas que pudieron ser canuladas hasta al útero respecto al grupo control (Candappa y col., 2009). Además, la administración de Dinoprostone en ovejas en fase luteal, aumenta la penetrabilidad cervical para facilitar la transferencia de embriones (Candappa y Bartlewski, 2014). Si bien Bartlewski y col. (2015) no encontraron un aumento de la penetrabilidad cervical en ovejas ciclando luego del tratamiento con Dinoprostone, hubo una disminución del tiempo necesario para completar la IA transcervical, sugiriendo que el Dinoprostone facilita el procedimiento. A pesar de que en este trabajo también se evaluó el efecto de la administración de Dinoprostone sobre la tasa de preñez, la baja fertilidad detectada en este experimento impidió sacar conclusiones al respecto. No hemos encontrado otros trabajos que evalúen el efecto de la administración de Dinoprostone sobre la fertilidad.

En resumen, se ha demostrado que la Ox y la PGE2 pueden facilitar la canulación cervical en ovejas ciclando. Sin embargo, el mecanismo de acción de estas hormonas no está completamente dilucidado. Conocer el mecanismo a través del cual la Ox y la PGE2 inducen a la dilatación cervical en la oveja ciclando, es importante para el desarrollo de protocolos que maximicen la penetración cervical, evitando o disminuyendo sus efectos negativos sobre la fertilidad.

1.4 Mecanismo de dilatación cervical

La dilatación cervical ha sido estudiada fundamentalmente al parto (Challis y col., 2000, Weems y col., 2006, Timmons y col., 2010). Además de la dilatación del cérvix que ocurre al parto, la dilatación del cérvix también es observada al estro (Kershaw y col., 2005) y su función podría asociarse a facilitar el transporte de espermatozoides hacia el útero luego de la monta (Hawk y col., 1978). El mecanismo a través del cual se produce la dilatación del cérvix de la oveja durante el estro aún no se encuentra completamente dilucidado. El aumento de la penetrabilidad cervical al estro con respecto a la fase lútea, sugiere que altos niveles de estrógenos y bajos de progesterona estimulan la dilatación del cérvix (Kershaw y col., 2005), aunque no debería descartarse que otras hormonas también participen de la regulación del mecanismo de dilatación cervical. En acuerdo con lo anterior, el tratamiento con Ox y PGE2 previo a la IA en ovejas ha logrado dilatar el cérvix, sugiriendo que estas hormonas también estarían involucradas en el mecanismo de dilatación cervical (Khalifa y col., 1992; Candappa y col., 2009). Al estro, se detectó un aumento de los receptores de Ox (ROx) y de PGE2 (EP), indicando que la sensibilidad del órgano a la acción de estas hormonas aumenta en respuesta a altos niveles de estrógenos y bajos de progesterona (Falchi y Scaramuzzi, 2013). El rol de la Ox y la PGE2 en la dilatación del cérvix de la oveja al estro aún no está clara, aunque se ha propuesto que la Ox ejercería su acción de manera indirecta al estimular la síntesis de PGE2 (Kershaw y col., 2007; Falchi y col., 2015).

La PGE2 es una hormona derivada del ácido araquidónico, un componente de las membranas fosfolípicas (Simmons y col., 2004). Brevemente, para que la síntesis de la PGE2 ocurra es necesario que el ácido araquidónico sea liberado de las membranas fosfolípicas, lo que se produce en respuesta a la acción de la fosfolipasa A2 (Falchi y col., 2015). El ácido araquidónico liberado es convertido a prostaglandina H2 por la actividad de las ciclooxigenasas- 1 y -2 (COX-1 y COX-2).

Posteriormente, la prostaglandina H2 es convertida a PGE2 por la PGE sintasa (Charpigny y col. 1997).

La regulación de la síntesis de PGE2 en el cérvix se ejerce principalmente a nivel de la COX-2 ya que la COX-1 se expresa de manera constitutiva en la mayoría de los tejidos (Charpigny y col. 1997). En el cérvix de la oveja, la expresión de la COX-2 y la síntesis de PGE2 está regulada por los estrógenos (Falchi y Scaramuzzi, 2013; Falchi y col., 2015). En cérvix bovino al estro, se ha reportado que la Ox estimula la expresión de la COX-2 y la liberación de PGE2 *in vivo* e *in vitro* (Shemesh y col., 1997; Fuchs y col., 2002). Sin embargo, la regulación de la síntesis de PGE2 por la Ox en la oveja aún no está tan clara posiblemente debido a los escasos reportes existentes. En el cérvix de la oveja durante el estro, se detectó un aumento del ROx en las células del estroma cervical (Ayad y col., 2004), coincidiendo con la mayor expresión de COX-2 en este mismo compartimento histológico (Kershaw y col., 2007; Rodríguez-Piñón y col., 2014). A pesar de esto, la administración de Ox no modificó la expresión de COX-2 ni la concentración cervical de PGE2 en estudios realizados *in vitro* (Falchi y col., 2015). Sin embargo, en este mismo estudio, la Ox aumentó la fosfolipasa A2 incrementando así la concentración del sustrato de la COX-2, el ácido araquidónico, lo que estimuló indirectamente la actividad de COX-2. Esto sugiere que la Ox podría estimular la síntesis de PGE2 en el cérvix de la oveja. En la figura 3 se presentan los pasos de la síntesis de PGE2 y su regulación por estrógenos y Ox en el cérvix de la oveja durante el estro.

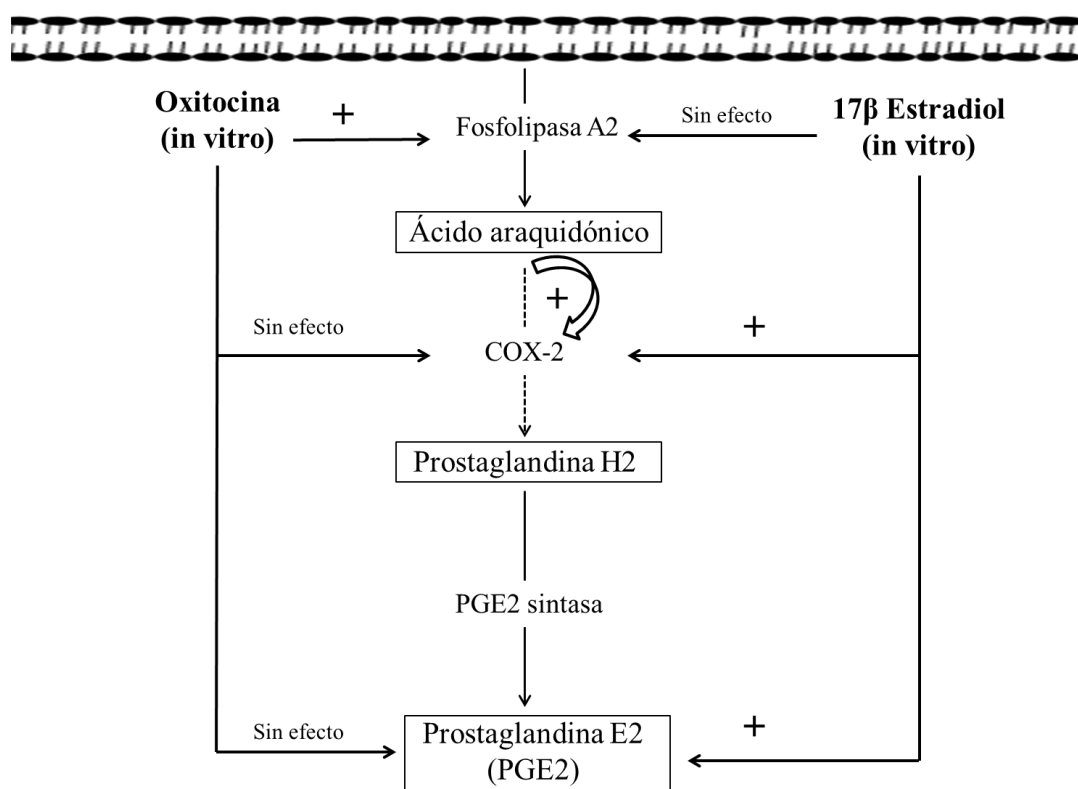


Figura 3: Pasos de la síntesis de PGE2 y su regulación por estradiol y oxitocina en el cérvix de la oveja durante el estro. Para que la síntesis de la PGE2 ocurra es necesario que el ácido araquidónico sea liberado de las membranas fosfolípídicas, lo que se produce en respuesta a la acción de la Fosfolipasa A2 que es estimulada por oxitocina. El ácido araquidónico es el sustrato y regulador positivo de la

ciclooxigenasa-2 (COX-2), enzima clave en la síntesis de la PGE2. La COX-2 aumenta su actividad en respuesta al incremento del ácido araquidónico y a la acción de los estrógenos dando lugar a un aumento de la concentración cervical de Prostaglandina H2 que posteriormente es convertida a PGE2 por la acción de la PGE2 sintasa.

La PGE2 actúa a través de cuatro tipos de receptores denominados EP1, EP2, EP3 y EP4 (Bakker y col., 2017). En el cérvix de la oveja, la expresión de EP2 fue mayor alrededor del estro que en la fase luteal, sugiriendo que la PGE2 podría estimular la dilatación del cérvix en la oveja al estro, actuando principalmente a través de EP2 (Kershaw y col., 2009). En este mismo trabajo se reportó que el receptor EP2 se expresa predominantemente en el músculo liso. En la mujer, la PGE2 actúa a través de receptores EP2 y EP4 estimulando la relajación del músculo liso del cérvix, lo que favorece la dilatación del órgano durante el parto (Roos y col., 2014; Bakker y col., 2017). Por lo tanto, la relajación del músculo liso podría ser parte de la acción de la PGE2 en la dilatación del cérvix de la oveja durante el estro.

En cérvix de la oveja, la expresión de EP2 y EP4 también se detectó en el estroma constituido principalmente por tejido conjuntivo y el aumento de EP2 coincidió con un aumento en la concentración de glucosaminoglucanos, particularmente del ácido hialurónico (Kershaw y col., 2009). Los glucosaminoglucanos y el colágeno son los principales constituyentes estructurales del tejido conjuntivo cervical (Timmons y col., 2010). Durante el parto, cambios en el contenido y en la organización estructural de estos componentes son determinantes en la remodelación del tejido conjuntivo que culmina con la dilatación del cérvix (por revisión ver Gibb y col., 2006). En la oveja alrededor del estro, el incremento de los glucosaminoglucanos fue asociado a una mayor dispersión y separación de las fibras de colágeno (Kershaw y col., 2007). Se ha propuesto que los glucosaminoglucanos se acumularían entre las fibras de colágeno estimulando la desorganización estructural del colágeno cervical facilitando la dilatación del cérvix (Kershaw y col., 2007; Kershaw y col., 2009). Estudios *in vitro* realizados en cérvix de coneja preñada, han demostrado que la PGE2 puede estimular la síntesis de glucosaminoglucanos (Maradny y col., 1997). A pesar de que la regulación de la síntesis de glucosaminoglucanos por la PGE2 no fue demostrada en el cérvix de la oveja durante el estro, la administración de Misoprostol, un análogo de PGE1 que actúa a través del mismo receptor que la PGE2, aumentó el contenido cervical de los glucosaminoglucanos y la penetrabilidad cervical (Leethongdee y col., 2010). Por lo tanto, se ha propuesto que la PGE2 además de estimular la relajación del músculo liso cervical, promovería también la dispersión de las fibras de colágeno al estro causando la dilatación cervical.

En resumen, basado en las evidencias que hay hasta el momento, el mecanismo de dilatación cervical propuesto en la oveja establece que durante el estro: el aumento de los estrógenos determina una mayor sensibilidad del cérvix (en términos de receptores) a la acción de la Ox y la PGE2. La Ox, actuando a través de su receptor, induciría la producción de PGE2. La PGE2 se uniría a sus receptores EP2 y EP4 en el músculo liso y los fibroblastos del estroma cervical, estimulando la relajación del músculo liso y la síntesis de glucosaminoglucanos. La acumulación de glucosaminoglucanos en el estroma causaría la dispersión y separación de las fibras de colágeno culminando con la dilatación cervical. En la figura 6 se presenta un

diagrama del mecanismo de dilatación cervical propuesto para la oveja al estro y su regulación por los 17β estradiol, Ox y PGE.

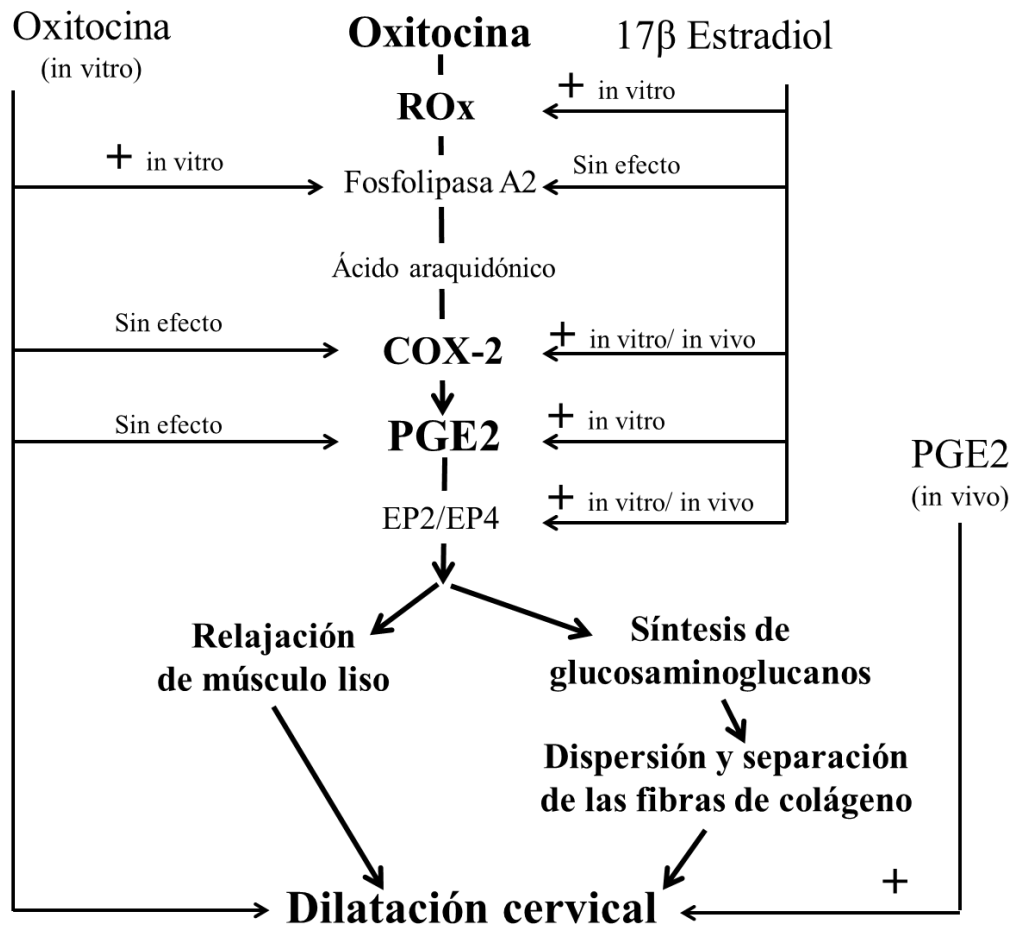


Figura 4: Diagrama del mecanismo de dilatación cervical propuesto para la oveja durante el estro y su regulación por los estrógenos (17β estradiol), oxitocina y PGE2. Durante el estro, los estrógenos estimulan la expresión del receptor de Ox (ROx) y de los receptores de PGE2 (EP2 y EP4) en el cérvix. La unión de la Ox a su receptor estimula la fosfolipasa A2 que libera ácido araquidónico de las membranas fosfolípídicas. El ácido araquidónico es el sustrato y regulador positivo de la COX-2, enzima clave en la síntesis de la PGE2. La COX-2 aumenta su actividad en respuesta al incremento del ácido araquidónico y a la acción de los estrógenos dando lugar a un aumento de la concentración cervical de PGE2. La PGE2 actuando a través de EP2 y EP4 estimularía la relajación del músculo liso y la síntesis de glucosaminoglucanos. La acumulación de glucosaminoglucanos en el estroma causaría la dispersión y separación de las fibras de colágeno culminando con la dilatación cervical.

1.4.1 Degradación del colágeno cervical y metaloproteinasas de la matriz extracelular

Durante el estro, además de la dispersión y separación de las fibras de colágeno se detectó un aumento de la degradación de las fibras de colágeno comparado con la fase luteal (Rodríguez-Piñón y col., 2015). Esto sugiere que la degradación del

colágeno cervical podría actuar como un mecanismo complementario a la relajación del músculo liso y a la dispersión y separación de las fibras de colágeno, contribuyendo al aumento de la penetrabilidad cervical de la oveja durante el estro.

La degradación del colágeno del cérvix depende de la actividad de enzimas pertenecientes a la familia de las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs) (Curry y col., 2003). La familia de las MMPs está constituida por más de 25 enzimas estructuralmente muy similares entre sí, que pueden agruparse en 4 grandes clases de acuerdo a la especificidad por su sustrato: colágenas, gelatinasas, estromelisin y enzimas tipo membrana. Las MMP-2 y 9, también conocidas como gelatinasas A y B respectivamente, son la subclase de las metaloproteinasas responsables fundamentalmente de degradar el colágeno parcialmente desnaturalizado (Hulboy y col., 1997). Las MMPs son sintetizadas mayoritariamente bajo forma de pro-enzimas (forma latente) y luego secretadas a la matriz extracelular donde son activadas (forma activada) (Hulboy y col., 1997). El proceso de activación ocurre mediante proteólisis limitada llevada a cabo fundamentalmente por otras MMPs (Curry y col., 2003). Las MMPs pueden ser reguladas por hormonas, citoquinas inflamatorias y factores de crecimiento y este control puede ejercerse a nivel transcripcional (regulación ejercida a nivel de la expresión de la enzima) y a nivel postranscripcional (regulación ejercida a nivel de activación de la enzima) (Hulboy y col., 1997; Nagase y col., 2006).

En la oveja al día 1 del ciclo, se ha reportado un incremento de la expresión de la MMP-2 en la zona craneal del cérvix. La mayor expresión de la MMP-2 durante la fase folicular se acompañó de un aumento de su actividad, con niveles de la forma activada de la MMP-2 de 10 a 20 veces mayores que en la fase lútea (Rodríguez-Piñón y col., 2015). Concomitante al aumento en la expresión y activación de la MMP-2, se registró la disminución del contenido de colágeno (Rodríguez-Piñón y col., 2015). Estos datos sugieren que en el cérvix de la oveja alrededor del estro, los altos niveles de estrógenos y bajos de progesterona promueven la degradación del colágeno cervical estimulando la actividad de la MMP-2. A su vez, en el cérvix de la oveja al estro, el aumento del ARNm de ROx y de EP2 en células del estroma (Ayad y col., 2004; Kershaw-Young y col., 2009) coincidió temporalmente con el incremento de la expresión y de la actividad de la MMP-2 en los fibroblastos (Rodríguez-Piñón y col., 2015). Esto sugiere que, bajo el predominio estrogénico alrededor del estro, la Ox y la PGE2 podrían participar en la regulación de la degradación de colágeno dependiente de MMP-2. En acuerdo con lo anterior, se ha demostrado que la Ox estimula la actividad colagenolítica en el tejido folicular en la mujer, aunque no se estudió de qué forma la Ox ejercería su acción (Norström y col., 1986). Considerando que la Ox podría estimular la síntesis de PGE2 por el tejido cervical (Kershaw y col., 2007; Falchi y col., 2015), podría especularse que la acción de la Ox sobre las MMP-2 podría estar mediada en parte por la PGE2. En este sentido, estudios *in vitro* realizados en cérvix de coneja preñada, han demostrado que la PGE2 estimula la actividad gelatinasa (Maradny y col., 1996). En acuerdo con lo anterior, la PGE2 causó un aumento de las concentraciones cervicales de las MMP-2 y 9 en ratas gestadas a término (Lyons y col., 2002). Por otro lado, se ha reportado también que en la mujer alrededor del parto, la PGE2 aumentaría la expresión de la MMP-9 al promover la infiltración de células inflamatorias en el cérvix que actúan como fuente de MMP-9 (Sahlin y col., 2008; Winkler y col., 1999; Stygar y col., 2002; Van Engelen y col., 2008; Rodríguez-Piñón y col., 2015). En conjunto, los

datos sugieren que la Ox y la PGE2 podrían regular la degradación del colágeno cervical a través de la MMP-2 y/o 9.

La degradación del colágeno cervical por la MMP-2 y/o 9 en respuesta a la Ox y/o PGE2 podría ejercerse de manera diferencial entre zonas cervicales ya que se ha reportado que la zona caudal y craneal del cérvix difiere no solo desde un punto de vista anatómico sino que también molecular (Halbert y col., 1990b, Rodríguez-Piñón y col., 2008). En este sentido, el porcentaje de células positivas a MMP-2 fueron mayores en la zona caudal que en la craneal del cérvix (Rodríguez-Piñón y col., 2015). En este mismo estudio se detectó que la zona caudal también tuvo un menor porcentaje de fibras de colágeno con respecto a la craneal, sugiriendo que esta zona tendría un mayor potencial de degradación del colágeno que la zona craneal. Esto podría deberse a que la degradación del colágeno en el cérvix de la oveja es regulado de manera diferencial entre zonas cervicales. Se ha reportado que la expresión del ROx fue menor en la zona caudal del cérvix respecto a la zona craneal (Rodríguez-Piñón y col., 2014). Contrariamente, la mayor expresión del ARNm de EP2 y EP4 fue observada en la zona caudal del cérvix, coincidiendo con la mayor inmunotinción de la MMP-2 (Rodríguez-Piñón y col., 2015; Kershaw-Young y col., 2009). La expresión diferencial de los receptores de Ox y PGE2 entre zonas cervicales, sugiere que la sensibilidad cervical a la acción de estas hormonas varía entre zonas cervicales y que por lo tanto el efecto de la Ox y la PGE2 sobre la degradación del colágeno también podrían diferir entre zonas cervicales.

Además de todo lo mencionado anteriormente respecto al mecanismo de dilatación cervical y teniendo en cuenta que el tratamiento de Ox y PGE2 por separado estimulan la dilatación cervical, es esperable que un tratamiento combinado de estas hormonas sea más efectivo. Sin embargo, no hemos encontrado reportes que evalúen los efectos de la administración de Ox y PGE2 en un tratamiento combinado sobre la penetrabilidad cervical y sus mecanismos moleculares regulatorios. La Ox estimula la liberación cervical de PGE2 (Shemesh 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. Además, 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.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis general

La administración de análogos de Ox y PGE2 de larga acción (OxL y PGE2L) aumentan la penetrabilidad cervical en ovejas mediante la inducción de la degradación del colágeno cervical y este aumento es mayor cuando ambas hormonas se administran en un tratamiento combinado.

2.2. Objetivo general

Determinar si la administración sola o combinada de análogos de Ox y PGE2 de larga acción (OxL y PGE2L) antes del momento esperado de la IA (54 h post eCG) aumenta la penetrabilidad y la degradación del colágeno cervical en ovejas.

2.3. Objetivos específicos

- Determinar si la administración sola o combinada de análogos de Ox y PGE2 de larga acción (OxL y PGE2L) afecta las siguientes variables a las 54 h post eCG:
 - ✓ Penetrabilidad cervical.
 - ✓ Concentración de colágeno cervical.
 - ✓ Actividad de las metaloproteinasas -2 y 9 (MMP-2 y -9) de la matriz extracelular.
- Determinar si la administración sola o combinada de análogos de Ox y PGE2 de larga acción (OxL y PGE2L) afecta la concentración de colágeno y la actividad de las MMP-2 y -9 de manera diferencial entre la zona cervical caudal y craneal a las 54 h post eCG.

3. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Estrategia general

El experimento de esta Tesis se realizó en ovejas de raza Corriedale. La raza Corriedale es utilizada mundialmente para la producción de carne y leche y constituye una de las principales razas de ovinos explotadas en Uruguay. Se trabajó con las ovejas durante la estación reproductiva (abril), momento en que se realiza la IA en la mayoría de los establecimientos productores de ovinos en Uruguay. Para evaluar el efecto de la OxL y la PGE2L sobre la penetrabilidad cervical y las variables moleculares asociadas a su mecanismo de acción al momento de la IATF, se realizaron cuatro tratamientos con OxL y PGE2L en un arreglo factorial 2x2. Este diseño experimental nos permitió evaluar el efecto de la OxL y la PGE2L sobre las variables estudiadas cuando estas hormonas son administradas solas o combinadas, basado en el supuesto que la administración conjunta de OxL y PGE2L mejoraría la respuesta individual de cada una de las hormonas observada cuando son administradas solas.

La OxL utilizada fue Carbetocina administrada por vía i.m mientras que la PGE2L fue Dinoprostone administrada en forma de dispositivo intravaginal de liberación lenta. Para considerar el efecto que pudiera tener la inyección i.m o la presencia del dispositivo intravaginal sobre las variables estudiadas se adoptó como estrategia que a los animales que fueron tratados solo con OxL se les colocó también dispositivo intravaginal placebo y a los animales que fueron tratados solo PGE2L se les administró también solución salina i.m. en igual volumen que para el grupo tratado solo con OxL. Los animales pertenecientes al grupo control recibieron inyección de solución salina i.m y un dispositivo intravaginal placebo.

Debido a que el objetivo de la aplicación de OxL y/o PGE2L es facilitar la canulación cervical al momento previsto para la IATF, la elección del momento en que los tratamientos fueron administrados se basó en el momento esperado de IATF para el protocolo de sincronización de la ovulación utilizado en este experimento y la vida media y los antecedentes reportados para el uso de OxL y/o PGE2L para inducir dilatación cervical. Con el protocolo de sincronización de la ovulación utilizado en este experimento, la ovulación ocurre aproximadamente a las 60 h de la administración de la eCG (Barrett y col., 2004) y el momento óptimo para la IA es a las 54h post eCG (Olivera-Muzante y col., 2011). Para confirmar el momento de la ovulación de las ovejas sincronizadas y teniendo en cuenta que este momento podría afectarse con el tratamiento con OxL y PGE2L (Davis y col., 1999; Armstron y col., 1981; Li y col., 2006), se realizaron ecografías seriadas desde 12 h post ecG hasta el momento de la ovulación. Si bien no encontramos información sobre la vida media de la Carbetocina en la oveja, en la yegua y en la mujer la vida media de la carbetocina es de 17 y 40 minutos, respectivamente (Sweeney y col., 1990; Schramme y col., 2008). Aunque la vida media reportada para la Carbetocina es solo de algunos minutos, estudios en vacas postparto han demostrado que la actividad biológica desencadenada en respuesta a la Carbetocina podría prolongarse por 12 h (Bajcsy y col., 2006). El Dinoprostone, un análogo estructuralmente idéntico a la PGE2 natural administrada en forma de dispositivo intravaginal (Cervidil®) proporciona un incremento gradual de las concentraciones plasmáticas de PGE2. El Dinoprostone es liberado del dispositivo a una tasa de 0,3 mg/h por 12 h (FDA, 2007). Los trabajos que han utilizado Dinoprostone en ovejas fueron efectivos en

disminuir el tiempo necesario para la canulación cervical cuando fue administrado 12 h antes de la IA, pero no 24 h antes (Candappa y col., 2009; Bartlewski y Candappa 2015). Basándonos en los antecedentes expuestos previamente que demuestran que los efectos de la OxL (Carbetocina) y la PGE2L (Dinoprostone) podrían extenderse por 12 h, los tratamientos de inducción de la dilatación cervical con OxL y/o PGE2L se realizaron a las 42 h post eCG, 12 h antes del momento previsto para la IATF. (54 h post eCG).

La penetrabilidad cervical fue medida en tres momentos luego del retiro de la esponja de acetato de medroxiprogesterona (MAP) y la administración de eCG. Medir la penetrabilidad cervical a las 0 y a las 42 h post eCG permite evaluar el incremento de la penetrabilidad cervical que se produce en respuesta al tratamiento de sincronización y que es independiente de los tratamientos aplicados para inducir dilatación cervical. Debido a que el objetivo de la aplicación de OxL y/o PGE2L es facilitar la canulación cervical al momento previsto para la IATF y que el protocolo de sincronización utilizado en este experimento prevé la IATF a las 54 h post eCG, la penetrabilidad cervical también fue medida a las 54 h post eCG. La penetrabilidad cervical se midió usando una sonda de transferencia de embriones bovina graduada similar a lo descrito por Leethongdee y col. 2007 y en condiciones similares a las utilizadas en una IA convencional en Uruguay. La metodología utilizada en este experimento para la determinación de las variables moleculares asociadas al mecanismo de acción de la OxL y la PGE2L (concentración de colágeno y de la actividad de las MMP-2 y -9) ya fue utilizada previamente en cervix de oveja (Rodríguez-Piñón y col., 2015).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Animales y tratamientos

El experimento se realizó en el Campo Experimental N° 2 de la Facultad de Veterinaria, Migués, Canelones, Uruguay (35° S), durante el mes de abril (estación reproductiva) del año 2016. Se utilizaron 40 ovejas Corriedale multíparas de tamaño similar y con un peso de $46,0 \pm 0,9$ kg (media $\pm$ EE). Durante el experimento, las ovejas permanecieron pastoreando campo natural con agua *ad libitum*. El protocolo de experimentación fue aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA), Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay (PI No 07/12).

Se sincronizó la ovulación de todas las ovejas a través de la administración intravaginal de una esponja impregnada con 60 mg de MAP (Syntex, Buenos Aires, Argentina) por 13 días y la administración de 300 UI de eCG i.m. (Novormon 5000®, Syntex, Buenos Aires, Argentina) al momento de retirar las esponjas (0 h). Las ovejas fueron adjudicadas a cuatro grupos experimentales de 10 animales cada uno, homogéneos de acuerdo a su peso corporal. A las 42 h post eCG (12 h antes del momento esperado de la IATF), cada grupo fue asignado de manera aleatoria a uno de cuatro tratamientos en un arreglo factorial 2x2. Los tratamientos fueron: grupo OxL, las ovejas recibieron 2 mL (40µg) i.m. de Carbetocina (Decomotón, Laboratorios Callier, Uruguay) y un dispositivo intravaginal placebo ; grupo PGE2L, las ovejas recibieron 10 mg de Dinoprostone en un dispositivo intravaginal de liberación lenta (Cervidil, Propess®, Ferring Pharmaceuticals Ltd., West Drayton, UK) y 2 mL i.m. de solución salina ; grupo OxL+PGE2L, las ovejas recibieron ambas hormonas administradas en simultáneo y de igual forma que lo descrito previamente para los grupos OxL y PGE2L y grupo Control (C) las ovejas recibieron 2 mL de solución salina i.m. y un dispositivo intravaginal placebo. La aplicación de los dispositivos intravaginales se realizó lo más próximo al anillo cervical caudal posible, para lo que se utilizó un vaginoscopio, colocando el animal con el tren posterior elevado sobre un caballete.

4.2 Determinación del momento de la ovulación y concentración de progesterona sérica

Para determinar el momento de la ovulación en todos los animales se realizaron ecografías seriadas de ambos ovarios por vía transrectal a las 12, 20, 28, 36, 42, 48 y 54 h post eCG , utilizándose un ecógrafo portátil (Esaote My Lab One, Genova, Italia) con un transductor transrectal lineal de 10 MHz. Se midió el diámetro del folículo mayor en ambos ovarios y se siguió su crecimiento hasta su desaparición. El momento de la ovulación fue considerado como el momento de desaparición del folículo mayor conjuntamente con la visualización de un cuerpo hemorrágico. Se calculó el intervalo desde la administración de la eCG hasta el momento de la ovulación (intervalo eCG-ovulación) para todos los animales. Treinta y cuatro de los cuarenta animales ovularon antes de la administración de los tratamientos con PGE2L y/o OxL (42 h post eCG). Los seis animales que ovularon luego de los tratamientos fueron eliminados de los análisis estadísticos de todas las variables estudiadas en esta tesis. Cuatro de los seis animales que ovularon luego de los tratamientos fueron tratados solo con OxL, mientras que dos fueron tratados con Ox+PGE2L.

Se midió la concentración de la progesterona sérica de muestras sanguíneas colectadas por venopunción de la yugular a las 0, 12, 20, 28, 36, 42, 48 y 54 h post eCG, para confirmar que las ovejas estuvieran en fase folicular (se consideró ≤ 1 nM como la concentración de progesterona durante la fase folicular (Rodríguez-Piñón y col., 2008). Las muestras se colectaron en tubos sin anticoagulante y se centrifugaron por 10 min a 1500 x g. El suero obtenido fue congelado a -20°C hasta su posterior análisis.

Se realizó la determinación de la progesterona sérica por radioinmunoanálisis utilizando un kit comercial de fase sólida (Coat-A-Count; DPC, Los Ángeles, California, EUA). Todas las muestras se determinaron por duplicado en el mismo ensayo, siguiendo el protocolo del fabricante y lo descripto previamente para ovejas (Rodríguez-Piñón y col., 2008). La sensibilidad del ensayo fue de 0,84 nmol/L y el coeficiente de variación intraensayo fue de 12,2 %. Las determinaciones de progesterona se realizaron en el Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal de la Facultad de Veterinaria, UdelaR.

4.3 Determinación de la penetrabilidad cervical

Se determinó la penetrabilidad cervical (cm) utilizando una cánula de transferencia de embriones de uso bovino de punta roma y 3,2 mm de diámetro externo, cubierta con una manga protectora (Leethongdee y col, 2007). En el extremo posterior, se graduó la cánula con una escala de 0 a 7 cm con 1 mm de apreciación, de manera que el punto 0 estuviera ajustado al alinear los extremos anteriores de la cánula y la manga protectora.

Para la determinación de la penetrabilidad cervical se colocaron a las ovejas con sus cuartos traseros levantados sobre un caballete. Luego de que las ovejas fueran posicionadas, se introdujo un vaginoscopio lubricado con carboximetilcelulasa a través de la vulva hasta lograr la protrusión del orificio cervical externo. Luego de la visualización del orificio cervical externo, se comenzó a canular el cérvix, aplicando movimientos suaves, manteniendo subjetivamente el mismo grado de fuerza entre animales. La cánula fue forzada a avanzar a través del cérvix hasta encontrar una resistencia que imposibilitaba continuar la penetración. Cuando no fue posible el avance, se desplazó la manga protectora de la cánula hasta el orificio cervical externo y se realizaron las medidas en el extremo posterior graduado de la cánula. Las medidas de penetrabilidad cervical fueron realizadas por triplicado registrándose la mayor de ellas.

La penetrabilidad cervical se midió a las 0, 42 y 54 h post eCG, en todos los animales (grupos OxL, n=6; PGE2L, n=10; OxL+PGE2L, n=8; C, n=10). Al momento esperado de la IA (54 h post eCG), se eligieron al azar la mitad de los animales de cada grupo y se sacrificaron para la obtención del cérvix donde se realizaron las mediciones de penetrabilidad cervical postmortem y posteriormente las determinaciones de colágeno, proteínas y de la actividad de las MMP-2 y -9 (n=17; grupos OxL, n=3; PGE2L, n=5; OxL+ PGE2L, n= 4; C, n=5). Los animales fueron sacrificados utilizando perno cautivo (Dick KTBG (Friedr Dick GmbH y Co, Deizisau, Alemania). Luego del sacrificio, se removió el tracto reproductivo y se realizó la separación del cérvix del resto del tracto. La disección del tejido se realizó inmediatamente luego del sacrificio y a una temperatura de entre 0- 4 °C. Luego de la

dissección, se pesó el cérvix, se midió la longitud del mismo y se registró la penetrabilidad postmortem. La penetrabilidad postmortem se midió utilizando la misma cánula descrita para las mediciones in vivo y siguiendo el mismo procedimiento, con la salvedad de que durante las mediciones postmortem el cérvix pudo ser manipulado para facilitar la canulación. Se calculó el porcentaje de penetración cervical postmortem considerando la penetrabilidad postmortem y la longitud del cérvix (penetrabilidad cervical a las 54h post eCG postmortem/ largo del cérvix x 100). Se consideró que el animal había sido canulado hasta el útero si el porcentaje de penetración cervical postmortem fue mayor o igual a 100% del largo del cérvix. Además, se midió la distancia (cm) desde el orificio cervical externo hasta el segundo anillo cervical, y considerando la penetrabilidad postmortem se calculó la proporción de cervices que fueron canulados más allá del segundo anillo cervical.

4.4 Procesamiento de las muestras cervicales y determinación del contenido de agua y proteínas del cérvix

Se seccionó transversalmente el cérvix en tercios correspondientes a la zona craneal, zona media y zona caudal. Posteriormente, se seccionaron las zonas craneal y caudal de manera longitudinal obteniéndose dos segmentos iguales para la zona craneal y caudal que se congelaron en nitrógeno líquido y luego se almacenaron a -80°C hasta su posterior procesamiento. Luego de descongelados, se determinó el contenido de agua del cérvix en uno de los segmentos de cada zona cervical. El otro segmento de cada zona se pesó, cortó, homogenizó en PBS (pH=7,4) y se almacenó en alícuotas nuevamente a -80°C hasta que las determinaciones de proteínas, colágeno y de la actividad de las MMP-2 y -9 fueran realizadas (n=17, en cada cérvix se evaluaron 2 zonas cervicales, craneal y caudal por lo que se homogenizaron un total de 34 muestras).

El contenido de agua se determinó mediante desecación del tejido cervical hasta obtener un peso constante, técnica utilizada previamente en cérvix de oveja (Rodríguez-Piñón y col., 2015). Para ello se expuso el tejido cervical a 80°C por 3 h en estufa. El contenido de agua (%) se calculó mediante la diferencia entre los pesos cervicales antes y después de la desecación. La determinación de la concentración de proteínas totales se realizó mediante espectrofotometría de acuerdo al método de Lowry y col. (1951) en las muestras de cérvix homogeneizadas. Se calculó la concentración de proteínas a partir de una curva de calibración preparada con estándares de albúmina sérica bovina (Fraction V, Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA, 0,05 a 0,8 mg/mL, $r=0,9937$ $P < 0.0001$). Todas las muestras se determinaron en el mismo ensayo, con un coeficiente de variación del 7 % y una sensibilidad de 0,05 mg/mL. Las concentraciones de proteínas totales (mg/ml de homogenizado) fueron correlacionadas positivamente con la cantidad de tejido utilizado (mg/ml homogenizado) ($r=0,6236$, $n=17$, $P=0,005$), mostrando que el total de proteínas extraídas fue similar entre muestras. La concentración de proteínas totales se expresó como mg/mg de tejido seco, considerando el contenido de agua. La determinación del contenido de agua y de la concentración de proteínas totales del cérvix fue realizada para poder expresar el contenido de colágeno en mg/g de tejido seco y la actividad de las MMP-2 y -9 en ng/mg de proteínas.

4.5 Determinación de la concentración de colágeno

La cuantificación del colágeno se realizó indirectamente mediante la determinación espectrofotométrica de hidroxiprolina, técnica descrita previamente en cérvix de oveja (Rodríguez-Piñón y col., 2015). Se realizó la hidrólisis ácida de las muestras cervicales homogeneizadas con HCl (3,0 N) a 90°C por 24 h para liberar la hidroxiprolina y luego se llevó a pH=2,3 con NaOH (3,0 N). Posteriormente, se realizó la oxidación de la hidroxiprolina a pirrol con un agente oxidante (7% de Cloramina-T: agua: buffer fosfato salino, 7:100:500 v/v/v) por 15 min a temperatura ambiente. Se hizo reaccionar el pirrol con un reactivo cromogénico (30 g de 4 dimetilaminobenzaldehído, 45 ml de ácido perclórico al 60 % y 250 ml de propanol 2) a 70°C por 15 min y luego se midió la absorbancia a 550 nM. Se calculó la concentración de hidroxiprolina en función de una curva estándar de L-hidroxiprolina (Fluka, 56250, Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) preparada con HCl 0,01 N (los valores de los estándares de la curva fueron de 0,3 a 3,7 µg/mL, $r = 0,9862$ $P < 0,0001$) Todas las muestras se determinaron en el mismo ensayo, con un coeficiente de variación del 11 % y una sensibilidad de 0,3 µg/mL. La concentración de colágeno se calculó asumiendo que el contenido de hidroxiprolina era del 14% del total de colágeno y se expresó en mg/g de tejido seco considerando el contenido de agua del tejido (Rodríguez-Piñón y col., 2015).

4.6 Determinación de la actividad de las MMP-2 y -9

La determinación de la actividad gelatinolítica de las formas activada y latente de las MMP-2 y -9 en las muestras de cérvix homogeneizadas se realizó por zimografía en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, 7,5% de poliacrilamida) co-polimerizado con gelatina (2,5mg/ml; G9391; Sigma), como se describió para cérvix de oveja (Rodríguez-Piñón y col., 2015). Se realizó la dilución 1:1 de las muestras cervicales homogeneizadas en un buffer que contiene Tris-HCl 250-mM, 10% de glicerol, 2% dodecil sulfato sódico (SDS) y 0,0025% azul de bromofenol (pH= 7,6) y posteriormente las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta que las corridas electroforéticas fueran realizadas. Antes de cada corrida electroforética, se realizó la incubación de las muestras a 37 °C por 1 h para facilitar la homogenización de las muestras diluidas en SDS. Se realizó la siembra de 10 µl de cada muestra y las corridas electroforéticas se realizaron a 100V por 2h. Luego de la corrida electroforética, los geles se lavaron e incubaron en buffer 50-mM Tris/HCl (5 mM de CaCl_2 , 200 mM de NaCl, and 0,005% Brij 35, Sigma, pH 7.8) por 18h a 37°C para reconstituir la actividad enzimática. Luego, se realizó el teñido de los geles con 1% de Azul de Coomassie R-250 y su destañido. La actividad enzimática de A y L se visualizó como bandas claras sobre el gel azul producto de la degradación de la gelatina co-polimerizada con el gel. Los geles fueron escaneados y las imágenes fueron analizadas mediante el software ImageJ 1.46r usando el menu Analyze->Measure para medir el área y el número de píxeles por cada banda que luego fueron convertidas a unidades estándares usando la función Set Scale (Rodríguez-Piñón y col., 2015). Se calculó la concentración de la forma latente y activada de las MMP-2 de las muestras en función de curvas de calibración preparadas a partir de estándares recombinantes humanos (M9445, Sigma; 0,02–1 ng/ mL, $r = 0,9664$ y $r = 0,9884$ para la forma latente y activada de la MMP-2 respectivamente, $P = 0,001$). La actividad gelatinasa de la MMP-9 fue evaluada en cérvix craneal y caudal (un total de 34 muestras) pero fue detectada solo en 7/34 muestras cervicales evaluadas y además

estuvo en el límite de detección de la técnica por lo que no fue posible cuantificarla. Las concentraciones de los estándares medio y alto de la MMP-2 fueron sembrados en cada gel y el coeficiente de variación interensayo fue de 13,7 % y 17,4 % para la forma latente y 11,4 % y 16,3 % para la forma activada de la MMP-2. La actividad de la formas latente y activada de la MMP-2 fue expresada en ng/mg de proteína usando la concentración de proteína total expresada como mg/mg de tejido seco y se calculó la relación entre las formas activada/latente de la MMP-2.

4.7 Análisis estadístico

Para todas las variables se corroboró la normalidad en la distribución de los residuos mediante la prueba de Shapiro-Wilk. La penetrabilidad cervical y la relación A/L de la MMP-2 no presentaron distribución normal y ambas variables fueron normalizadas realizando la transformación mediante $\log(n+1)$. Para el análisis de los datos se utilizó un Análisis de Varianza 2x2 (ANOVA) de SAS (Statistical Analysis Systems SAS Institute, 2000; Carolina del Norte, EUA). Se consideró en el modelo como efectos principales la administración o no de OxL, la administración o no de PGE2L y su interacción. La penetrabilidad cervical a las 0, 42 y 54 h post eCG se analizó por ANOVA 2x2 para muestras repetidas incorporando como efectos fijos el tratamiento (OxL o PGE2L), las h post ecG (0, 42 y 54) y sus interacciones. La penetrabilidad cervical a las 0 h post eCG fue utilizada como covariable. Las medidas de penetrabilidad a las 54 h tomadas *in vivo* y post mortem se correlacionaron mediante el test de correlación de Pearson. El peso cervical, el contenido de agua, la concentración de proteínas totales y de colágeno y la actividad de las formas latente y activada de la MMP-2 se analizaron por ANOVA 2 x 2 para muestras simples, incorporando como efectos fijos el tratamiento (OxL o PGE2L), la zona cervical y sus interacciones. Los resultados se consideraron estadísticamente diferente cuando $P < 0,05$ y una tendencia cuando $0,05 < P \leq 0,1$. Los resultados se expresan como la media cuadrática mínima (LSM) $\pm$ SEM agrupada.

5. RESULTADOS

5.1 Momento de la ovulación y concentración de progesterona

Todos los animales (34/34) ovularon luego del tratamiento con MAP y de la aplicación de eCG, en el período comprendido entre las 12 y las 42 h post eCG. En la Figura 1 se presenta la distribución de las ovulaciones de los animales experimentales desde las 12 hasta las 42 h post eCG. Todos los animales mantuvieron niveles de progesterona sérica por debajo de 1 nM durante todo el período experimental.

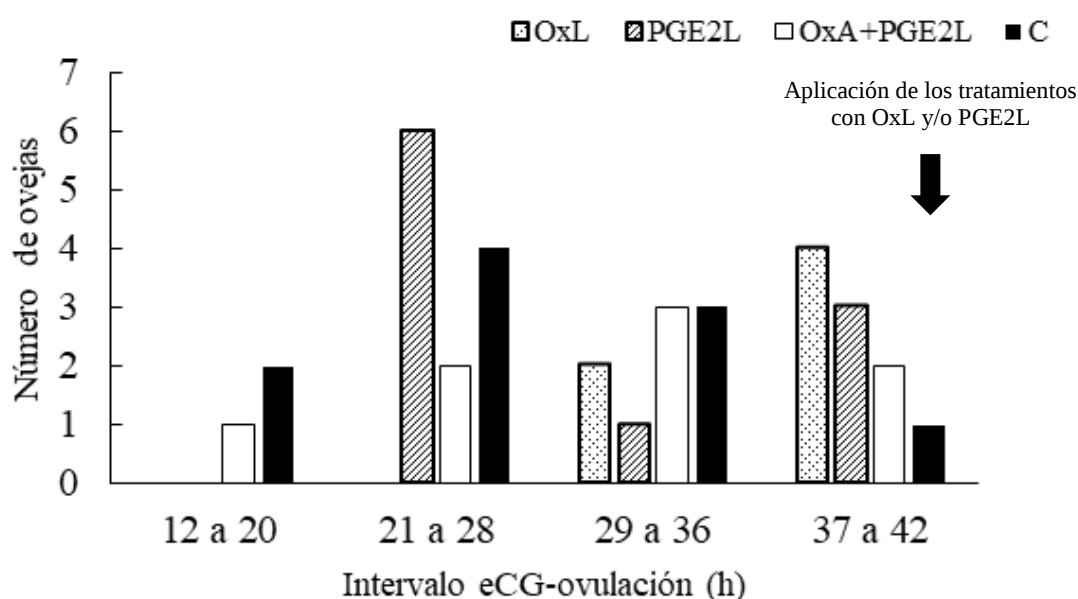


Figura 5. Intervalo eCG- ovulación de ovejas Corriedale sincronizadas con esponjas de acetato de medroxiprogesterona (60 mg, intravaginal) por 13 días seguida de la aplicación de eCG (300UI, im) al retirar las esponjas. A las 42 h post eCG (flecha negra) las ovejas fueron tratadas con: 2 mL (40µg) i.m de Carbetocina (Decomotón, Laboratorios Callier, Uruguay) y un dispositivo intravaginal placebo (grupo OxL, n=6); 10 mg de Dinoprostone en un dispositivo intravaginal de liberación lenta (Cervidil, Propess®, Ferring Pharmaceuticals Ltd., West Drayton, UK) y 2 mL i.m. de solución salina (grupo PGE2L, n=10); ambas hormonas administradas en simultáneo y de igual forma que lo descrito previamente para los grupos OxL y PGE2L (grupo OxL+PGE2L, n=8) y 2 mL de solución salina i.m y un dispositivo intravaginal placebo (grupo Control (C), n=10).

5.2 Penetrabilidad cervical

El Log (n+1) de la penetrabilidad cervical (medida *in vivo*) fue afectada por la h post eCG ($P < 0,0001$, n=34) y por la interacción entre los tratamientos y la h post eCG ($P = 0,03$, n=34). En todos los grupos experimentales la penetrabilidad cervical aumentó desde la administración de la eCG (0 h post eCG) hasta el momento de la administración de los tratamientos experimentales (42 h post eCG) sin diferencias entre grupos ($P < 0,0029$), (Figura 2). Desde la administración de los tratamientos hasta el momento esperado de la IATF (54 h post eCG) se detectó una disminución

de la penetrabilidad cervical en el grupo control ($P= 0,0207$) que no fue detectada en los grupos tratados. En el grupo PGE2L la penetrabilidad cervical se incrementó entre las 42 y las 54 h post eCG ($P= 0,0372$) mientras que en el mismo período no se detectaron diferencias en la penetrabilidad cervical en los grupos OxL y OxL+PGE2L.

A las 54 h post eCG, la penetrabilidad cervical fue mayor en todos los grupos tratados comparada con el control a la misma hora, sin diferencias entre grupos ($P< 0,0373$). En el Cuadro 1 se presentan la penetrabilidad cervical en cm para los grupos C, OxL, PGE2L y OxL+PGE2L a las 0, 42 y 54 h post eCG.

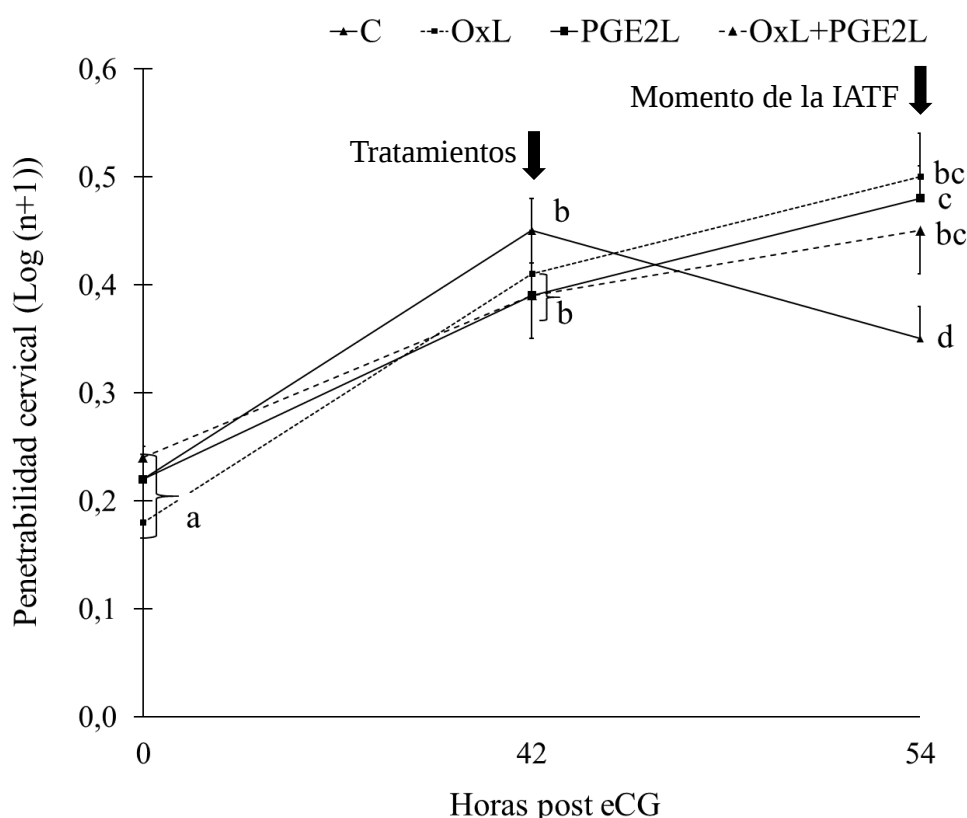


Figura 6. Penetrabilidad cervical (Log (n+1), mean±sem) a las 0, 42 y 54 h post eCG en ovejas (n= 34) sincronizadas con acetato de medroxiprogesterona (60 mg, intravaginal) por 13 días seguida de la aplicación de eCG (300UI, im) al retirar la esponja. A las 42 h post eCG las ovejas fueron tratadas con: 2 mL (40µg) i.m de Carbetocina (Decomotón, Laboratorios Callier, Uruguay) y un dispositivo intravaginal placebo (grupo OxL, n=6); 10 mg de Dinoprostone en un dispositivo intravaginal de liberación lenta (Cervidil, Propess®, Ferring Pharmaceuticals Ltd., West Drayton, UK) y 2 mL i.m. de solución salina (grupo PGE2L, n=10); ambas hormonas administradas en simultáneo y de igual forma que lo descrito previamente para los grupos OxL y PGE2L (grupo OxL+PGE2L, n=8) y 2 mL de solución salina i.m y un dispositivo intravaginal placebo (grupo Control (C), n=10). Diferentes letras indican diferencias en el tiempo y entre grupos.

Cuadro 1. Penetrabilidad cervical (cm, mean±sem) *in vivo* a las 0, 42 y 54 h post eCG y postmortem a las 54 h post eCG en ovejas sincronizadas con acetato de medroxiprogesterona (60 mg, intravaginal) por 13 días seguida de la aplicación de eCG (300UI, im) al retirar la esponja. A las 42 h post eCG las ovejas fueron tratadas con: 2 mL (40µg) i.m de Carbetocina (Decomotón, Laboratorios Callier, Uruguay) y un dispositivo intravaginal placebo (grupo OxL); 10 mg de Dinoprostone en un dispositivo intravaginal de liberación lenta (Cervidil, Propess®, Ferring Pharmaceuticals Ltd., West Drayton, UK) y 2 mL i.m. de solución salina (grupo PGE2L); ambas hormonas administradas en simultáneo y de igual forma que lo descrito previamente para los grupos OxL y PGE2L (grupo OxL+PGE2L) y 2 mL de solución salina i.m y un dispositivo intravaginal placebo (grupo Control, C).

	Horas post eCG			
	0	42	54 <i>in vivo</i>	54 postmortem
C	0,73±0,12	1,95±0,22	1,41±0,29	1,78±0,07
OxL	0,40±0,18	1,42±0,31	1,94±0,32	2,43±0,58
PGE2L	0,72±0,11	1,51±0,15	2,11±0,15	2,68±0,29
OxL+PGE2L	0,84± 0,12	1,66±0,26	2,15±0,42	2,65± 1,17

La penetrabilidad cervical *in vivo* se midió a las 0, 42 y 54 h post eCG, en todos los animales (n= 34, grupos OxL, n=6; PGE2L, n=10; OxL+PGE2L, n=8; C, n=10) mientras que la penetrabilidad postmortem se midió únicamente al momento esperado de la IA (54 h post eCG) en la mitad de los animales de cada grupo elegidos al azar (n=17; grupos OxL, n=3; PGE2L, n=5; OxL+ PGE2L, n= 4; C, n=5).

La penetrabilidad cervical (cm) a las 54h post eCG medida *in vivo* se correlacionó positivamente con la penetrabilidad medida postmortem ($r=0,8209$; $P<0,002$, $n=17$). El porcentaje de penetración cervical postmortem (penetrabilidad cervical a las 54h post eCG postmortem/ largo del cérvix x 100) no fue afectado por los tratamientos ($32,7\pm11,7$; $38,7\pm9,1$; $44,1\pm10,1$; $26,2\pm9,1$ grupos OxL; PGE2L; OxL+ PGE2L y C, respectivamente). El porcentaje de penetración cervical postmortem promedio de todos los cervices canulados postmortem fue $35,2 \pm 5,0$ % ($n=17$). Solo uno de los cervices obtenidos postmortem pudo ser canulado hasta el útero, este cérvix pertenecía al grupo OxL+PGE2L.

El número de anillos cervicales promedio de todos los animales experimentales fue $4,0 \pm 1,0$ y la distancia media al segundo anillo cervical fue de $2,0 \pm 0,1$ cm ($n=17$). A las 54 h post eCG solo en 3/17 cervices la profundidad de penetración cervical (cm) supero la distancia al segundo anillo cervical, uno de estos cervices pertenecía al grupo de animales tratados con OxL y 2 al grupo OxL+PGE2L.

5.3 Peso cervical, contenido de agua y proteínas solubles totales

El peso cervical tendió a estar afectado por el tratamiento con OxL ($P=0,08$, $n= 17$; $20,5\pm1,5$ y $16,8\pm1,2$ g, animales tratados y no tratados con OxL, respectivamente; los animales no tratados con OxL incluyen los controles y los tratados solo PGE2L). El peso cervical no fue afectado por el tratamiento con PGE2L u OxL+PGE2L. El contenido de agua (%) fue afectado por la interacción del tratamiento con OxL y PGE2L ($P=0,031$, $n=17$). El grupo OxL tuvo menor contenido de agua cervical con respecto al grupo C y al grupo OxL+PGE2L ($85,8\pm 2,0$ vs. $92\pm 1,5$, $P=0,019$ y $85,8\pm 1$ vs. $91,5\pm1,7$, $P= 0,0378$; respectivamente).

La concentración proteínas solubles totales (mg proteína/g de tejido seco) no fue afectada por los tratamientos con OxL, PGE2L ni la interacción del tratamiento con OxL y PGE2L. La concentración de proteínas solubles totales fue diferente solo entre zonas cervicales ($P= 0,05$, $n=17$). La concentración de proteínas solubles totales fue menor en la zona caudal con respecto a la zona craneal del cérvix ($767,4 \pm 72,6$ vs. $982,4 \pm 72,6$, respectivamente para cada zona). No se detectó interacción entre los tratamientos con la zona cervical.

5.4 Concentración de colágeno

La concentración del colágeno cervical (mg/g de tejido seco) fue afectada por el tratamiento con PGE2L ($P= 0,03$, $n= 17$) y la interacción del tratamiento con OxL y PGE2L ($P=0,002$, $n=17$). Además, se detectó una interacción del tratamiento con OxL y PGE2L y la zona cervical ($P=0,04$, $n=17$). Independientemente del tratamiento, no se detectaron diferencias en la concentración de colágeno entre zonas cervicales. En la zona craneal la concentración del colágeno fue menor en el grupo OxL comparada con el grupo PGE2L ($P= 0,0507$), y tendió a ser menor respecto al grupo OxL+PGE2L ($P= 0,0905$) (Cuadro 2). En la zona caudal la concentración del colágeno fue menor en el grupo OxL comparada con el grupo C ($P=0,006$) y con el grupo OxL+PGE2L ($P= 0,002$). No se detectaron diferencias en la concentración del colágeno entre el grupo OxL y PGE2L. La concentración del colágeno en el grupo PGE2L fue menor con respecto al grupo OxL+PGE2L ($P=0,019$) y tendió a ser menor con respecto al grupo C ($P=0,062$) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Concentración del colágeno (mg/g de tejido seco) en cérvix craneal y caudal de ovejas sincronizadas con acetato de medroxiprogesterona (60 mg, intravaginal) por 13 días seguida de la aplicación de eCG (300UI, im) al retirar la esponja y tratadas a las 42 h post eCG con: 2 mL (40µg) i.m de Carbetocina (Decomotón, Laboratorios Callier, Uruguay) y un dispositivo intravaginal placebo (grupo OxL); 10 mg de Dinoprostone en un dispositivo intravaginal de liberación lenta (Cervidil, Propess®, Ferring Pharmaceuticals Ltd., West Drayton, UK) y 2 mL i.m. de solución salina (grupo PGE2L); ambas hormonas administradas en simultáneo y de igual forma que lo descrito previamente para los grupos OxL y PGE2L (grupo OxL+PGE2L) y 2 mL de solución salina i.m y un dispositivo intravaginal placebo (grupo Control, C). Las muestras cervicales fueron obtenidas 12 h luego de la administración de los tratamientos (54 h post eCG) en la mitad de los animales elegidos al azar (n=17; grupos OxL, n=3; PGE2L, n=5; OxL+ PGE2L, n= 4; C, n=5, en cada cérvix se evaluaron 2 zonas cervicales, craneal y caudal por lo que se evaluaron un total de 34 muestras).

	Colágeno (mg/ tejido seco)	
	Craneal	Caudal
C	195,5± 25,4 ab	217,1± 25,4 a*c
OxL	131,1± 32,8 a*	92± 32,8 b
PGE2L	216,3± 25,0 b	147,1± 25,4 a*b
OxL+PGE2L	207,6± 28,4 a*b	251± 32,8 c

Dentro de cada columna los valores (mean±s.e.m.) con distintas letras difieren significativamente (P<0,05). Las letras seguidas de un asterisco tienden a ser diferentes (P=0,06).

5.5 Actividad de las MMP-2 y -9

La actividad de las MMP-2 y 9 fue estudiada en todas las muestras (n=17; grupos OxL, n=3; PGE2L, n=5; OxL+ PGE2L, n= 4; C, n=5, en cada cérvix se evaluaron 2 zonas cervicales, craneal y caudal por lo que se evaluaron un total de 34 muestras). La actividad gelatinasa de la MMP-9 fue detectada solo en 7 de 34 muestras cervicales evaluadas y estuvo en el límite de detección de la técnica por lo que no fue posible cuantificarla. La actividad de la MMP-2 fue detectada en 33/34 muestras cervicales evaluadas. La actividad de las formas latente y activada de la MMP-2 fue visualizada como dos bandas intensas que migraron a 72 y 62 kDa y que se correspondieron con los estándares de la MMP-2 (Figura 7).

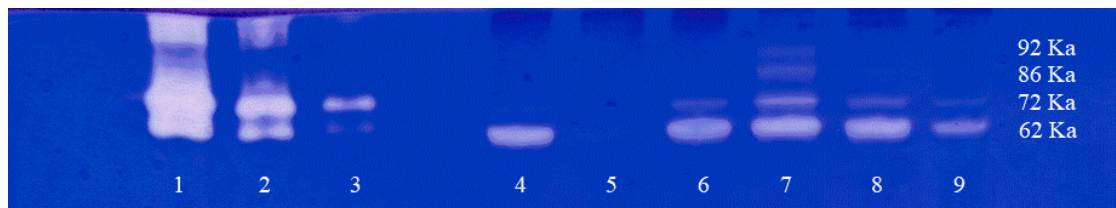


Figura 7. Actividad de la MMP-2 determinada por zimografía en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) co-polimerizado con gelatina en ovejas sincronizadas con acetato de medroxiprogesterona (60 mg, intravaginal) por 13 días seguida de la aplicación de eCG (300UI, im) al retirar la esponja y tratadas a las 42 h post eCG con: 2 mL (40µg) i.m de Carbetocina (Decomotón, Laboratorios Callier, Uruguay) y un dispositivo intravaginal placebo (grupo OxL); 10 mg de Dinoprostone en un dispositivo intravaginal de liberación lenta (Cervidil, Propess®, Ferring Pharmaceuticals Ltd., West Drayton, UK) y 2 mL i.m. de solución salina (grupo PGE2L); ambas hormonas administradas en simultáneo y de igual forma que lo descrito previamente para los grupos OxL y PGE2L (grupo OxL+PGE2L) y 2 mL de solución salina i.m y un dispositivo intravaginal placebo (grupo Control, C). Las muestras cervicales fueron obtenidas 12 h luego de la administración de los tratamientos (54 h post eCG) en la mitad de los animales elegidos al azar (n=17; grupos OxL, n=3; PGE2L, n=5; OxL+ PGE2L, n= 4; C, n=5, en cada cervix se evaluaron 2 zonas cervicales, craneal y caudal. Línea 1, 2 y 3: 10 µl de estándar recombinante humano de la forma latente y activada de la metaloproteinasa de la matriz extracelular -2 (MMP-2) (72 y 62 kDa, respectivamente, Sigma–Aldrich, M9445; 1,0; 0,250 y 0,03ng/ml en cada línea, respectivamente). Líneas 4 a 9: 10 µl de homogenizado de cervix de ovejas de los grupos OxL, OxL+PGE2L, OxL, C, OxL+PGE2L y C, respectivamente. En la línea 7 se puede observar dos bandas que migraron a 86 y 92 kDa y que se corresponden a la forma L y A de la MMP-9.

La actividad de la forma latente de la MMP-2 fue afectada solo por la zona cervical ($P=0,0026$, $n=17$). La actividad de la forma latente de la MMP-2 (ng/mg de proteínas) fue mayor en la zona caudal con respecto a zona craneal del cervix ($0,81 \pm 0,11$ vs. $0,26 \pm 0,11$). No se detectó efecto de los tratamientos ni interacción entre los tratamientos con la zona cervical en la actividad de la forma latente de la MMP-2.

La actividad de la forma activada de la MMP-2 fue afectada por el tratamiento con OxL ($P=0,04$, $n=17$), pero no por el tratamiento con PGE2L u OxL+PGE2L. Hubo una tendencia de la zona cervical sobre la actividad de las forma activada de la MMP-2 ($P=0,07$, $n=17$). No se detectó interacción entre los tratamientos con la zona cervical sobre la actividad de la forma activada de la MMP-2. La actividad de la forma activada de la MMP-2 (ng/mg de proteínas) fue mayor en los animales tratados con OxL con respecto a los animales no tratados con OxL ($18,9 \pm 3,0$ vs. $10,9 \pm 1,9$; $n=17$; $P=0,04$).

La relación de las formas activada/latente de la MMP-2 ($\log (n+1)$) no fue afectada por los tratamientos ni por la zona cervical, tampoco se detectó una interacción entre los tratamientos con la zona cervical. Los promedios de la relación de las formas activada/latente de la MMP-2 para los grupos fueron: $1,4 \pm 0,1$; $1,5 \pm 0,2$; $1,3 \pm 0,1$ y $1,6 \pm 0,13$. para los grupos C; OxL, PGE2L y OxL+PGE2L, respectivamente.

6. DISCUSIÓN

En esta Tesis se demuestra el efecto de la administración de OxL, de PGE2L y de su combinación, sobre la penetrabilidad cervical y la degradación del colágeno cervical en ovejas luego de la sincronización de la ovulación. Luego de la administración de eCG para inducir la ovulación, la penetrabilidad cervical aumentó en todos los animales hasta el momento del tratamiento con OxL y/o PGE2L (desde las 0 a las 42 h post eCG). Este aumento de la penetrabilidad cervical luego de la inducción de la ovulación fue similar al reportado por Falchi y col (2012) y Leethongdee y col (2007) y responde a un aumento de la concentración de estrógenos producto del crecimiento folicular (Kershaw y col., 2005). En los animales del grupo control, la penetrabilidad disminuyó a partir de las 42 h post eCG, probablemente debido a que todos los animales ovularon antes de ése momento con la consiguiente pérdida del estímulo estrogénico. La administración de OxL o PGE2L, solas o combinadas a las 42 h post eCG, prolongó en el tiempo el incremento de la penetrabilidad generada en respuesta a la sincronización de la ovulación, evitando la disminución de la penetrabilidad cervical observada en el control luego de las 42 h post eCG. Como resultado, al momento esperado de la IATF (54 h post eCG), todos los animales tratados tuvieron mayor penetrabilidad cervical que los animales controles, sin presentar diferencias entre sí. Estos datos demuestran que la administración de OxL y/o PGE2L incrementa la penetrabilidad cervical en ovejas Corriedale luego de la sincronización de la ovulación.

A las 54 h post eCG, los cervixes de los animales tratados con OxL presentaron un menor contenido de colágeno con respecto al grupo control. Además, en estos mismos animales, hemos observado un aumento de la concentración de la forma activada de la MMP-2, sugiriendo que la OxL estimuló la activación de la MMP-2, disminuyendo el contenido de colágeno cervical por esta vía. La acción de la Ox sobre la degradación del colágeno en tejidos reproductivos ha sido escasamente estudiada. Norström y col. (1986) observó que la Ox estimula la actividad colagenolítica en el folículo preovulatorio en la mujer, aunque no se estudió de qué forma la Ox ejercería su acción. Interesantemente, el menor contenido de colágeno cervical en respuesta al tratamiento con OxL fue observado en la zona caudal, caracterizada por una menor expresión de ROX con respecto a la craneal (Rodríguez-Piñón y col., 2014). Dado que la Ox estimula la síntesis de PGE2 por el tejido cervical (Schemesh y col., 1997; Fuchs y col., 2002) y que la expresión de los receptores de PGE2 (EP2 y EP4) es mayor en la zona cervical caudal que la craneal (Kershaw y col., 2009), se especula que parte del efecto de la OxL sobre el contenido de colágeno en la zona caudal del cérvix podría estar mediado por la síntesis de PGE2 endógena. En acuerdo con lo anterior, la administración de PGE2L tendió a disminuir el contenido de colágeno en la zona caudal del cérvix. Sin embargo, la administración de PGE2L no afectó la concentración de la forma activada de la MMP-2. Esto sugiere que la activación de la MMP-2 estimulada por OxL no estaría mediada por la síntesis de PGE2 endógena y que por lo tanto la PGE2L estimularía la degradación del colágeno cervical actuando a través de MMPs diferentes a la MMP-2. Además, el menor contenido de colágeno cervical observado en la zona caudal en respuesta a la OxL no se explicaría completamente por la activación de la MMP-2, ya que el aumento de la concentración de la forma activada de la MMP-2 fue independiente de la zona cervical. Esto sugiere que el menor contenido de colágeno cervical observado en la zona caudal en respuesta al tratamiento con OxL sería

producto de la acción de la MMP-2 actuando conjuntamente con otras MMPs. Al parto, se ha reportado que la MMP-2 actúa conjuntamente con la MMP-9 contribuyendo a la degradación del colágeno cervical que culmina con la relajación del cérvix (Lyons y col., 2002; Stygar y col., 2002; Sahlin y col., 2008). La escasa actividad de la MMP-9 observada en este trabajo, que coincide con lo reportado en ovejas durante el ciclo estral natural (Rodríguez-Piñón y col., 2015), sugiere que la MMP-9 no estaría involucrada en la degradación del colágeno cervical en el cérvix de la oveja ciclando. En conjunto los datos obtenidos indican que la OxL estimula la degradación del colágeno cervical en la zona caudal del cérvix a través de la MMP-2 y que esta acción probablemente sea mediada conjuntamente por otras MMPs. El aumento de la degradación del colágeno coincidió temporalmente con la mayor penetrabilidad cervical detectada a las 54 h post eCG en los animales tratados con OxL con respecto al control. Por lo tanto, se puede concluir que la administración de OxL aumenta la penetrabilidad cervical en ovejas mediante la inducción de la degradación del colágeno cervical.

A pesar del menor contenido de colágeno cervical detectado en los animales tratados con OxL, hemos observado que a las 54 h post eCG el peso del cérvix de estos animales tendió a ser mayor que el de los animales control. Interesantemente, este aumento del peso cervical se acompañó también de una disminución en el contenido de agua sin variaciones en la concentración de proteínas totales. Esto sugiere que el aumento del peso del cérvix en los animales tratados con OxL se debe a un aumento del contenido sólido no proteico de su tejido conjuntivo, lo que podría estar asociado a una mayor concentración del glucosaminoglucano conocido como ácido hialurónico, el principal componente no proteico del tejido conjuntivo cervical (Fosang y Handley, 1988). En membranas fetales humanas obtenidas al parto, se reportó que la Ox estimuló la síntesis de ácido hialurónico (Tjugum y Norstriim, 1985). Al estro, el acúmulo de ácido hialurónico en el estroma estuvo asociado a un incremento de la dispersión y separación de las fibras de colágeno del cérvix que resultó en un aumento de la penetrabilidad cervical con respecto a la fase lútea (Kershaw y col., 2005; 2007; 2009). El aumento del peso cervical en los animales tratados con OxL coincidió temporalmente con el aumento de la degradación del colágeno y la mayor penetrabilidad cervical detectada a las 54 h post eCG en estos animales. Esto podría sugerir que la mayor penetrabilidad cervical detectada al momento esperado de la IATF en los animales tratados con OxL podría ser el resultado de un proceso de remodelación del conjuntivo cervical que involucre no solo la degradación de las fibras de colágeno sino que también su dispersión y separación producto del acúmulo de ácido hialurónico en el estroma, aunque los resultados obtenidos en esta tesis no nos permite concluir al respecto. En este sentido, sería interesante estudiar la respuesta al tratamiento con OxL del contenido de ácido hialurónico y la organización de las fibras de colágeno del cérvix de ovejas.

La administración combinada de OxL y PGE2L no mejoró la respuesta de la penetrabilidad cervical en comparación a la administración de la OxL y la PGE2L solas. Además, hemos observado que en el tratamiento combinado los efectos de la OxL sobre la degradación de colágeno desaparecieron. Estos resultados podrían asociarse a diferencias en el entorno hormonal entre los grupos en respuesta al protocolo de la sincronización de celos utilizado en este estudio. Si bien todos los animales ovularon antes de la aplicación de los tratamientos y tuvieron concentraciones similares de progesterona durante todo el período experimental, la

dispersión observada en el momento de la ovulación, y por lo tanto las concentraciones de estrógenos, pudo haber favorecido la acción de la OxL o de la PGE2L solas con respecto al tratamiento combinado. En acuerdo con lo anterior, se ha reportado que los estrógenos aumentan la concentración del ROx y de los receptores de PGE2, EP2 y EP4 (Kershaw y col., 2010; Falchi y col., 2015; Kershaw y col., 2009). A pesar de no observarse un aumento significativo en la degradación del colágeno cervical en respuesta al tratamiento de PGE2 y OxL+PGE2L, a las 54 h post eCG la penetrabilidad cervical de los animales de ambos grupos fue mayor que el control. Esto sugiere que otros mecanismos como la relajación del músculo liso y la dispersión de las fibras de colágeno mediados por PGE2, reportados por Kershaw y col (2007; 2009) y Leethongdee y col. (2007; 2010), podrían estar actuando para favorecer la mayor penetrabilidad cervical detectado en los grupos PGE2 y OxL+PGE2L a las 54 h post eCG.

A las 54 h post eCG, la penetrabilidad cervical postmortem promedio en los animales tratados en nuestro trabajo fue aproximadamente 2 cm, lo que correspondió alrededor de un tercio del largo del cérvix y coincidió con la distancia reportada entre el orificio cervical externo del cérvix y el segundo anillo cervical. El segundo anillo, ubicado en la zona caudal del cérvix, es uno de los principales obstáculos en el pasaje transcervical de la cánula de inseminar, ya que este anillo presenta un gran desarrollo y además está desalineado con respecto al primero determinando un gran estrechamiento del canal cervical en esta zona (Halbert et al, 1990; Casali y col., 2017). El hecho que la penetrabilidad cervical postmortem se correlacionó positivamente con la penetrabilidad cervical *in vivo* nos permite sugerir que el segundo anillo cervical fue también la principal limitante para canular más profundamente el cérvix *in vivo*. Casali y col., (2017) utilizando la técnica de canulación transcervical descrita por Fonseca y col. (2013; 2016) reportaron que para alcanzar una fertilidad similar a la observada con laparoscopia, la deposición del semen por vía transcervical debe ser realizada a más de 4 cm de profundidad del cérvix de ovejas razas Corriedale, lo que se alcanzó en menos del 30% de las ovejas. Además, en este mismo estudio se observó que en menos del 10% de los animales el semen pudo ser depositado en el útero. Los autores sugirieron que la efectividad de la vía transcervical en ovejas de raza Corriedale podría ser baja comparados con los resultados obtenidos previamente para otras razas (Fonseca y col., 2016). Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que los tratamientos con OxL y PGE2L no permitieron dilatar la zona caudal de manera suficiente para traspasar el segundo anillo y depositar el semen más próximo al útero en ovejas de raza Corriedale.

La máxima profundidad de penetración cervical alcanzada en los animales tratados fue detectada a las 54 h post eCG. Se ha reportado que entre las 54-60 h post-eCG es el momento óptimo de IA en animales sincronizados con MAP y eCG, ya que es donde se concentrarían la mayor parte de las ovulaciones (Olivera-Muzante y col. 2011; Abecia y col. 2012; Dos Santos Neto y col. 2015; Hoff de Souza y col., 1995). Sin embargo, en nuestro estudio los animales ovularon entre las 12 y las 42 h post eCG, sugiriendo que las 54 h post eCG podría no coincidir con el momento óptimo de IA bajo las condiciones de nuestro experimento. Las razones por las que la ovulación en nuestro experimento se produjo más temprano que lo reportado para animales sincronizados de manera similar no están claras. Sin embargo, podría especularse que la estimulación vaginal generada por el espéculo y la cánula de inseminar durante las mediciones de la penetrabilidad cervical a las 0 h post eCG,

promovió la síntesis endógena de Ox por el tejido cervical lo que estimuló la ovulación de los animales. En acuerdo con lo anterior, la estimulación vaginal con la cánula de inseminar durante la IA de ovejas nulíparas causó un incremento en las concentraciones plasmáticas de Ox (Houdeau y col., 2002). Además, se ha reportado que la Ox afectó el crecimiento folicular en ratas adultas (Robinson y col., 1991) y la administración i.m de Ox a ovejas durante el posparto adelantó el tiempo a la ovulación (Fletcher y col., 1973). La respuesta de los animales al protocolo de sincronización de la ovulación utilizada en este experimento limitó en parte la interpretación de los resultados obtenidos en esta tesis. Alternativamente, para el estudio de variables moleculares, se podría realizar la detección de celo y aplicar los tratamientos en ese momento de esta forma lograríamos un ambiente hormonal más homogéneo.

7. CONCLUSIONES

La administración de OxL, PGE2L y su combinación en ovejas Corriedale prolongó en el tiempo el incremento de la penetrabilidad cervical generada en respuesta al tratamiento con MAP y eCG, específicamente en el período comprendido entre las 42 y las 54 h post eCG. Como resultado, al momento esperado de la IATF (54 h post eCG), todos los animales tratados tuvieron mayor penetrabilidad cervical que los animales controles, sin presentar diferencias entre sí. Los efectos de la OxL sobre la penetrabilidad cervical podrían explicarse en parte por un aumento de la degradación del colágeno mediada por la MMP-2 mientras que la PGE2 actuaría fundamentalmente a través de un mecanismo diferente a la degradación del colágeno. Los tratamientos con OxL y PGE2L no permitieron dilatar la zona caudal de manera suficiente para traspasar el segundo anillo y depositar el semen más próximo al útero en ovejas de raza Corriedale.

8. BIBLIOGRAFÍA

Abecia, J.A., Forcada, F., González-Bulnesb A. (2012). Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Animal Reproduction Science*, 130: 173– 179

Álvarez, M., Chamorro, C. A., Kaabi, M., Anel-Lopez, L., Boixo, J. C., Anel, E., De Paz, P. (2012). Design and “in vivo” evaluation of two adapted catheters for intrauterine transcervical insemination in sheep. *Animal Reproduction Science*, 131: 153–159.

Armstrong DT. (1981). Prostaglandins and follicular functions. *Journal of Reproduction and Fertility* 62: 283-291.

Atke, A., Vilhardt, H. (1987). Uterotonic activity and myometrial receptor affinity of 1-deamino-1-carba-2-tyrosine(O-methyl)-oxytocin. *Acta Endocrinologica (Copenh)* 115: 155-160.

Ayad, V.J., Leung, S.T., Parkinson, T.J., Wathes, D.C. (2004). Coincident increases in oxytocin receptor expression and EMG responsiveness to oxytocin in the ovine cervix at oestrus. *Animal Reproduction Science* 80: 237-250.

Bajcsy, Á. C., Szenci, O., van der Weijden, G. C., Doornenbal, A., Maassen, F., Bartyik, J., Taverne, M. A. M. (2006). The effect of a single oxytocin or carbetocin treatment on uterine contractility in early postpartum dairy cows. *Theriogenology*, 65: 400–414.

Bakker, R., Pierce, S., y Myers, D. (2017). The role of prostaglandins E1 and E2, dinoprostone, and misoprostol in cervical ripening and the induction of labor: a mechanistic approach. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 296: 167–179.

Barrett, D. M. W., Bartlewski, P. M., Batista-Arteaga, M., Symington, A., & Rawlings, N. C. (2004). Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to a single dose of 500 IU of eCG following a 12-day treatment with progestogen-releasing intravaginal sponges in the breeding and nonbreeding seasons in ewes. *Theriogenology*, 61: 311–327.

Bartlewski, P. M., y Candappa, I. B. R. (2015). Assessing the usefulness of prostaglandin E2 (Cervidil) for transcervical artificial insemination in ewes. *Theriogenology*, 84: 1594–1602.

Brummer, H. C. (1971). Interaction of E prostaglandins and syntocinon on the pregnant human myometrium. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 78: 305–309.

Buckrell, B. C., Buschbeck, C., Gartley, C. J., Kroetsch, T., McCutcheon, W., Martin, J., Walton, J. S. (1994). Further development of a transcervical technique for artificial insemination in sheep using previously frozen semen. *Theriogenology*, 42: 601–611.

Campbell, J. W., Harvey, T. G., McDonald, M. F., Sparksman, R. I. (1996). Transcervical insemination in sheep: an anatomical and histological evaluation. *Theriogenology*, 45: 1535–1544.

Candappa, B. R., Bainbridge, H. C., Price, N. T., Hourigan, K. R., Bartlewski, P. (2009). A preliminary study on the suitability of Cervidil® to induce cervical dilation for artificial insemination in ewes. *Research in Veterinary Science*, 87: 204–206.

Candappa, B.R., Bartlewski, P. (2011). 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. *The Open Reproductive Science Journal*, 3: 162-175.

Candappa, B.R, Bartlewski, P. (2014). Induction of cervical dilation for transcervical embryo transfer in ewes. *Reproductive Biology Endocrinology*, 12: 1-9.

Casali, R., Pinczak, A., Cuadro, F., Guillen-Muñoz, J. M., Mezzalana, A., Menchaca, A. (2017). Semen deposition by cervical, transcervical and intrauterine route for fixed-time artificial insemination (FTAI) in the ewe. *Theriogenology*, 103: 30–35.

CGA (Censo General Agropecuario) 2011. Resultados definitivos [online]. Capítulo 3: 42. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/multimedia/censo2011.pdf>

Challis, J., Matthews, S., Gibb, W., Lye, S.J. (2000). Endocrine and paracrine regulation of birth at term and preterm. *Endocrine Reviews*, 21: 514-550.

Charpigny, G., Reinaud, P., Tamby, J.P., Créminon, C., Martal, J., Maclouf, J., Guillomot, M. (1997). Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in ovine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy. *Endocrinology*, 138: 2163-2171.

Curry, T.E., Osteen, K.G. (2003). The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endocrine Reviews*, 24: 428-65.

Davis BJ, Lennard DE, Lee CA, Tiano, H.F, Morham, S.G, Wetsel, W.C, Langenbach, R. (1999). Anovulation in cyclooxygenase-2 deficient mice is restored by prostaglandin E2 and interleukin-1b. *Endocrinology* 142:3187-3197

Dos Santos-Neto, P. C., García-Pintos, C., Pinczak, A., Menchaca, A. (2015). Fertility obtained with different progestogen intravaginal devices using Short-term protocol for fixed-time artificial insemination (FTAI) in sheep. *Livestock Science*, 182, 125–128.

- Eppleston, J., Salamon, S., Moore, N. W., Evans, G. (1994). The depth of cervical insemination and site of intrauterine insemination and their relationship to the fertility of frozen-thawed ram semen. *Animal Reproduction Science*, 36: 211–225.
- Engstrøm, T., Barth, T., Melin, P., Vilhardt, H. (1998). Oxytocin receptor binding and uterotonic activity of carbetocin and its metabolites following enzymatic degradation. *European Journal of Pharmacology*, 355: 203–210.
- Fabian, M., Forsling, M., Jones, J. (1969). The clearance and antidiuretic potency of neurohypophyseal hormones in man, and their plasma binding and stability. *Journal of Physiology*, 204:653–8.
- Falchi, L., Taema, M., La Clanche, S., Scaramuzzi, R. J. (2012). The pattern of cervical penetration and the effect of topical treatment with prostaglandin and/or FSH and oxytocin on the depth of cervical penetration in the ewe during the peri-ovulatory period. *Theriogenology*, 78: 376–384.
- Falchi, L., y Scaramuzzi, R. J. (2013). The expression of ER α , OTR, cPLA2, COX-2, and PPAR γ in the cervix of the ewe during the estrous cycle. *Theriogenology*, 79: 40–47.
- Falchi, L., Scaramuzzi, R.J. (2015) An in vitro investigation of the actions of reproductive hormones on the cervix of the ewe in the follicular stage: The effects of 17 β -estradiol, oxytocin, FSH, and arachidonic acid on the cervical pathway for the synthesis of prostaglandin E2. *Theriogenology*, 83:1007-1014.
- FDA (2007). Cervidil official FDA information, side effects and uses. Retrieved November 9, 2008, from <<http://www.drugs.com/pro/cervidil.html>>.
- Fierro, S., Olivera, J., Gil, J., Durán, J., Durán, G. (2009). Preguntas y respuestas sobre la IATF en ovinos asociada a inseminación intrauterina y a la refrigeración de semen. Disponible en http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_ovina/inseminacion_ovinos/26-IATF_ovinos.pdf
- Fletcher, I.C. (1973). Effects of lactation, suckling and oxytocin on post-partum ovulation and oestrus in ewes. *Journal of reproduction and fertility*, 33: 293-298.
- Flint, A.P.F., Sheldrick, E.L. (1986). Ovarian oxytocin and the maternal recognition of pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility*, 76: 831-839.
- Flint, A.P.F., Sheldrick, E.L., McCann, T.J, Jones, D.S.C. (1990). Luteal oxytocin: characteristics and control of synchronous episodes of oxytocin and PGF2 α secretion at luteolysis in ruminants. *Domestic Animal Endocrinology*, 7:111-124.
- Fonseca, J. F., Zambrini, F. N., Alvim, G. P., Peixoto, M. G. C. D., Verneque, R. S., Viana, J. H. M. (2013). Embryo production and recovery in goats by non-surgical transcervical technique. *Small Ruminant Research*, 111: 96–99.

- Fonseca, J. F., Souza-Fabjan, J. M. G., Oliveira, M. E. F., Leite, C. R., Nascimento-Penido, P. M. P., Brandão, F. Z., Lehloenya, K. C. (2016). Nonsurgical embryo recovery and transfer in sheep and goats. *Theriogenology*, 86:144–151.
- Fonseca, J. F., Zambrini, F. N., Guimaraes, J. D., Silva, M. R., Oliveira, M. E. F., Brandao, F. Z., Bartlewski, P. B., and Souza-Fabjan, J. M. G. (2018). Combined treatment with estradiol benzoate, d -cloprostenol and oxytocin permits cervical dilation and non-surgical embryo recovery in ewes. *Reproduction in Domestic Animals*. 00:1-8.
- Fonseca, J. F., Oliveira, M. E. F., Brandao, F. Z., Ribrio I. T. P. Batista, Garcia, A.R., Bartlewski, P.M, Souza-Fabjan, J. M. G. (2019) Non-surgical embryo transfer in goats and sheep: the Brazilian experience. *Reproduction, Fertility and Development*, 31: 17–26
- Fosang, A. J., Handley, C. J. (1988). Connective tissue remodelling in the ovine cervix during pregnancy and at term. *Connective Tissue Research*, 17: 277–285.
- Fuchs, A.R., Graddy, L.G., Kowalski, A.A., Fields MJ. (2002). Oxytocin induces PGE2 release from bovine cervical mucosa in vivo. *Prostaglandins and Other Lipid. Mediators*, 70: 119-129.
- Fukui, Y., Roberts, E. M. (1978). Further studies on non-surgical intrauterine technique for artificial insemination in the ewe. *Theriogenology*, 10: 381–393.
- Gibb, W., Lye, S.J., Challis, R.G. (2006). Parturition. En: Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*. Ed. J.D. Neill., Elsevier Academic Press, St. Louis, USA. pp. 2925-2974.
- Gil, J., Rodriguez-Irazoqui, M., Lundeheim, N., Söderquist, L., & Rodríguez-Martínez, H. (2003). Fertility of ram semen frozen in Bioexcell® and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology*, 59: 1157–1170.
- Gilbert, C. L., Jenkins, K., Wathes, D. C. (1991). Pulsatile release of oxytocin into the circulation of the ewe during oestrus, mating and the early luteal phase. *Journal of Reproduction and Fertility*, 91: 337–346.
- Goodman, R.L., Inskeep, E.K. (2006). Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the sheep. En: Neill JD. *Physiology of reproduction*. Ed. Elsevier 3ª ed. St. Louis, pp. 2389-2448.
- Halbert, G. W., Dobson, H., Walton, J. S., Sharpe, P. Buckrell, B. C. (1990). Field evaluation of a technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. *Theriogenology*, 33: 1231–1243.
- Halbert, G. W., Dobson, H., Walton, J. S., Buckrell, B. C. (1990a). A technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. *Theriogenology*, 33: 993–1010.

Halbert, G. W., Dobson, H., Walton, J. S., Buckrell, B. C. (1990b). The structure of the cervical canal of the ewe. *Theriogenology*, 33: 977–992.

Hawk, H. W., Conley, H. H., Cooper, B. S. (1978). Number of sperm in the oviducts, uterus, and cervix of the mated ewe as affected by exogenous estradiol. *Journal of Animal Science*, 46: 1300–1308.

Hoff de Souza, C.J, Martins, L., Moura, A., Ferrugem., J.C. (1995). Momento da ovulação em ovelhas corriedale após cio natural e induzido com progestágeno e eCG. *Ciencia Rural*, 25: 277-281.

Houdeau, E., Raynal, P., Marnet, P.-G., Germain, G., Mormède, P., Rossano, B., Prud'Homme, M.-J. (2002). Plasma levels of cortisol and oxytocin, and uterine activity after cervical artificial insemination in the ewe. *Reproduction Nutrition Development*, 42: 381–392.

Hulboy, D.L, Rudolph, L.A, Matrisian, L.M. (1997). Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Molecular Human Reproduction* 3: 27-45.

Juengel, J. L., Garverick, H. A., Johnson, A. L., Youngquist, R. S., Smith, M. F. (1993). Apoptosis during luteal regression in cattle. *Endocrinology*, 132: 249–254.

Kaabi, M., Alvarez, M., Anel, E., Chamorro, C. A., Boixo, J. C., De Paz, P., Anel, L. (2006). Influence of breed and age on morphometry and depth of inseminating catheter penetration in the ewe cervix: a postmortem study. *Theriogenology*, 66: 1876–1883.

Kershaw, C. M., Khalid, M., McGowan, M. R., Ingram, K., Leethongdee, S., Wax, G., Scaramuzzi, R. J. (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.

Kershaw, C.M., Scaramuzzi, R.J., McGowan, M.R., Wheeler-Jones, C.P., Khalid, M. (2007). The expression of prostaglandin endoperoxide synthase 2 messenger RNA and the proportion of smooth muscle and collagen in the sheep cervix during the estrous cycle. *Biology of Reproduction*, 76: 124-129.

Kershaw-Young, C. M., Khalid, M., McGowan, M. R., Pitsillides, A. A., & Scaramuzzi, R. J. (2009). The mRNA expression of prostaglandin E receptors EP2 and EP4 and the changes in glycosaminoglycans in the sheep cervix during the estrous cycle. *Theriogenology*, 72: 251–261.

Kershaw-Young, C.M., Scaramuzzi, R.J., McGowan, M.R., Pitsillides, A.A., Wheeler-Jones, C.P.D., Khalid, M. (2010). The effect of estradiol on COX-2, EP2, and EP4 mRNA expression and the extracellular matrix in the cervix of the hypogonadotrophic, ovariectomized ewe *Theriogenology*, 73 620–628.

Khalifa, R. M., Sayre, B. L., Lewis, G. S. (1992). Exogenous oxytocin dilates the cervix in ewes. *Journal of Animal Science*, 70: 38–42.

Killen, I, Caffery, G. (1982). Uterine insemination with the aid of a laparoscope. *Australian Veterinary Journal*, 59: 95.

King, M.E., McKelvey, W.A., Dingwall, W.S., Matthews, K.P., Gebbie, F.E., Mylne, M.J., Stewart, E, Robinson, J.J. (2004). Lambing rates and litter sizes following intrauterine or cervical insemination of frozen/thawed semen with or without oxytocin administration. *Theriogenology* 62: 1236-1244.

Leethongdee, S., Khalid, M., Bhatti, A., Ponglowhapan, S., Kershaw, C. M., Scaramuzzi, R. J. (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.

Leethongdee, S., Kershaw-Young, C. M., Scaramuzzi, R. J., 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.

Lightfoot, R.J. (1970). The contractile activity of the genital tract of the ewe in response to oxytocin and mating. *Journal of Reproduction and Fertility*, 21: 376.

Li, Q., Jimenez-Krassel, F., Kobayashi, Y., Ireland, J.J, Smith, G.W. (2006). Effect of intrafollicular indomethacin injection on gonadotropin surge-induced expression of select extracellular matrix degrading enzymes and their inhibitors in bovine preovulatory follicles. *Reproduction*, 131: 53–543.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193:265-275.

Lyons, C.A., Beharry, K.D., Nishihara, K.C., Akmal, Y., Ren, Z.Y., Chang, E., Nageotte, M.P. (2002). Regulation of matrix metalloproteinases (type IV collagenases) and their inhibitors in the virgin, timed pregnant, and postpartum rat uterus and cervix by prostaglandin E(2)-cyclic adenosine monophosphate. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 187: 202-208.

Maradny, E., Kanayama, N., Halim, A., Maehara, K., Sumimoto, K., Terao, T. (1996). Biochemical changes in the cervical tissue of rabbit induced by interleukin-8, interleukin-1 β dehydroepiandrosterone sulphate and prostaglandin E2: a comparative study. *Human Reproduction*, 11: 1099–1104.

Maradny, E, Kanayama, N., Kobayashi, H., Hossain, B., Khatun, S., Liping, S., Kobayashi, T., Terao, T. (1997). The role of hyaluronic acid as a mediator and regulator of cervical ripening. *Human reproduction*, 12: 1080-1088.

McCracken, J.A., Custer, E.E., Lamsa, J.C. (1999). Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physical Review*, 79:263-324.

Meidan, R., Milvae, R. A., Weiss, S., Levy, N., Friedman, A. (1999). Intraovarian regulation of luteolysis. *Journal of Reproduction and Fertility*, 54: 217–228.

Menchaca, A., Rubianes, E. (2004). New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*, 16: 403–413.

Menchaca, A. (2016) Inseminación artificial a tiempo fijo en ovinos .
<http://www.abc.com.py/edicion-impresa/suplementos/abc-rural/inseminacion-artificial-a-tiempo-fijo-en-ovinos---dr-alejo-menchaca--1516309.html>

Meshykhi, L. S., Nel, M. R., Lucas, D. N. (2016). The role of carbetocin in the prevention and management of postpartum haemorrhage. *International Journal of Obstetric Anesthesia*, 28: 61–69.

Moré, J. (1984). Anatomy and histology of the cervix uteri of the ewe: new insights. *Cells Tissues Organs*, 120: 156–159.

Nagase, H., Visse, R., Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research*, 69: 562–573.

Naqvi, S. M. K., Pandey, G. K., Gautam, K. K., Joshi, A., Geethalakshmi, V., Mittal, J. P. (2005). Evaluation of gross anatomical features of cervix of tropical sheep using cervical silicone moulds. *Animal Reproduction Science*, 85:337–344.

Norström, A., Tjugum, J. (1986) Hormonal Effects on Collagenolytic Activity in the Isolated Human Ovarian Follicular Wall. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 22: 12-16.

Olivera-Muzante J., Fierro S., López V., Gil J. (2011). Comparison of prostaglandin- and progesterone-based protocols for timed artificial insemination in sheep. *Theriogenology*, 75: 1232-1238.

Olivera-Muzante J., Fierro S. (2016). Inseminación artificial a tiempo fijo em ovinos: nuevas alternativas para incrementar su adopción. *Cangue*, 37:8.

Rath, W. (2009). Prevention of postpartum haemorrhage with the oxytocin analogue carbetocin. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 147: 15–20.

Robinson, G., Evans, J. (1991). Oxytocin influences preovulatory follicular development and advances ovulation in rats. *Acta Endocrinologica (Copenh)*, 125: 109-112.

Rawlings, N.C., Bartlewski, P.M. (2007). Reproductive physiology of ewes. En: Youngquist RS, Threlfall WR. *Current therapy in large animal theriogenology*. Ed. Elsevier 2ª ed. St. Louis, pp. 642-649.

Rodríguez-Piñón, M., Tasende, C., Puime, P., Garófalo, E. G. (2008). Oestrogen and progesterone receptor binding capacity and oestrogen receptor alpha expression (ER α mRNA) along the cervix of cycling ewes. *Reproduction, Fertility and Development*, 20: 350–356.

Rodríguez-Piñón, M., Gonzalez, R., Tasende, C., Bielli, A., Genovese, P., Garófalo, E. G. (2014). Cervical changes in estrogen receptor alpha, oxytocin receptor, LH receptor, and cyclooxygenase-2 depending on the histologic compartment, longitudinal axis, and day of the ovine estrous cycle. *Theriogenology*, 81: 813–824.

Rodríguez-Piñón, M., Tasende, C., Casuriaga, D., Bielli, A., Genovese, P., Garófalo, E. G. (2015). Collagen and matrix metalloproteinase-2 and-9 in the ewe cervix during the estrous cycle. *Theriogenology*, 84: 818–826.

Roos, N., Blesson, C. S., Stephansson, O., Masironi, B., Stjernholm, Y. V., Ekman- Ordeberg, G., Sahlin, L. (2014). The expression of prostaglandin receptors EP3 and EP4 in human cervix in post- term pregnancy differs between failed and successful labor induction. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 93: 159–167.

Salamon, S., Maxwell, W. M. C. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62: 77–111.

Salamon S, Lightfoot R. (1967). Fertility of ram spermatozoa frozen by the pellet method III. The effects of insemination technique, oxytocin and relaxin on lambing. *Journal of reproduction and fertility*, 22: 409-23.

Sahlin, L., Stjernholm-Vladic, Y., Roos, N., Masironi, B., Ekman- Ordeberg, G. (2008) Impaired leukocyte influx in cervix of postterm women not responding to prostaglandin priming. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 6:36

Sayre, B. L., Lewis, G. S. (1996). Cervical dilation with exogenous oxytocin does not affect sperm movement into the oviducts in ewes. *Theriogenology*, 45: 1523–1533.

Sayre B.L., Lewis G.S. (1997). Fertility and ovum fertilization rate after laparoscopic or transcervical intrauterine artificial in- semination of oxytocin-treated ewes. *Theriogenology*, 48: 267–75.

Scaramuzzi, R.J., Adams, N.R., Baird, D.T., Campbell, B.K., Downing, J.A., Findlay, J.K., Henderson, K.M., Martin, G.B., McNatty, K.P., Mc Neilly, A.S., Tsoni, C.G. (1993). A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reproduction, Fertility and Development* 5: 459-478.

Schramme, A. R., Pinto, C. R. F., Davis, J., Whisnant, C. S., Whitacre, M. D. (2008). Pharmacokinetics of carbetocin, a long- acting oxytocin analogue, following intravenous administration in horses. *Equine Veterinary Journal*, 40: 658–661.

Senger, P.L. (1999). Pathways to pregnancy and parturition. Ed. Current conceptions, Inc 2^a ed. Washington

Shemesh, M., Dombrovski, L., Gurevich, M., Shore, L.S., Fuchs, A.R., Fields, M.J. (1997). Regulation of bovine cervical secretion of prostaglandins and synthesis of cyclooxygenase by oxytocin. *Reproduction, Fertility and Development*, 9: 525-530.

Simmons, D. L., Botting, R. M., Hla, T. (2004). Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacological Reviews*, 56: 387-437.

Skarzynski, D. J., Ferreira- Dias, G., Okuda, K. (2008). Regulation of luteal function and corpus luteum regression in cows: hormonal control, immune mechanisms and intercellular communication. *Reproduction in Domestic Animals*, 43: 57-65.

Stellflug, J.N., Wulster-Radcliffe, M.C., Hensley, E.L., Cowardin, E.A., Seals, R.C., Lewis, G.S. (2001) Oxytocin-induced cervical dilation and cervical manipulation in sheep: effects on laparoscopic artificial insemination. *Journal of Animal Science* 79: 568-573.

Stouffer, R.L. (2006). Structure, function, and regulation of the corpus luteum. En: Neill JD. *Physiology of Reproduction*. Ed. Elsevier 3^a ed. New York, pp. 475-526.

Stygar, D., Wang, H., Vladic, Y.S., Ekman, G., Eriksson, H., Sahlin, L. (2002). Increased level of matrix metalloproteinases 2 and 9 in the ripening process of the human cervix. *Biology of Reproduction*, 67: 889-894.

Sweeney G, Holbrook AM, Levine M, Yip, M., Alfredsson, K., Cappi, S., Ohlin, M. Schulz, P., Wassenaar, W. (1990). Pharmacokinetics of carbetocin, a long-acting oxytocin analogue, in nonpregnant women. *Current Therapeutic Research*, 47:520-40.

Timmons, B., Akins, M., Mahendroo, M. (2010). Cervical remodeling during pregnancy and parturition. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 21: 353-361.

Thiery, J.C, Martin, G.B. (1991). Neurophysiological control of the secretion of gonadotrophin- releasing hormone and luteinizing hormone in the sheep. A review. *Reproduction Fertility Development*, 3: 137-173.

Tjugum, J., Norström, A. (1985). The influence of prostaglandin E, and oxytocin on the incorporation of [3H]proline and [3H]glucosamine in the human amnion *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 19: 137-143.

Van Engelen, E., Breeveld-Dwarkasing, V.N., Taverne, M.A., Everts, M.E., Van der Weijden, G.C., Rutten, V.P. (2008). MMP-2 expression precedes the final

ripening process of the bovine cervix. *Molecular Reproduction and Development*, 75 : 1669-1677.

Viñoles, C., Forsberg, M., Banchero, G., Rubianes, E. (2001). Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. *Theriogenology*, 55: 993–1004.

Wathes, D. C., Guldenaar, S. E. F., Swann, R. W., Webb, R., Porter, D. G., Pickering, B. T. (1986). A combined radioimmunoassay and immunocytochemical study of ovarian oxytocin production during the periovulatory period in the ewe. *Journal of Reproduction and Fertility*, 78: 167–183.

Weems, C., Weems, Y., Randel, R. (2006). Prostaglandins and reproduction in female farm animals. *Veterinary Journal* 17: 206-228.

Windsor, D. P. (1995). Factors influencing the success of transcervical insemination in Merino ewes. *Theriogenology*, 43: 1009–1018.

Winkler, M., Oberpichler, A., Tschesche, H., Ruck, P., Fischer, D.-C., Rath, W. (1999). Collagenolysis in the lower uterine segment during parturition at term: correlations with stage of cervical dilatation and duration of labor. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 181: 153–158.

Wulster-Radcliffe, M. C., Costine, B. A., Lewis G. S. (1999). Estradiol-17 beta-oxytocin-induced cervical dilation in sheep: application to transcervical embryo transfer. *Journal of Animal Science*, 77: 2587-2593.

Wulster-Radcliffe, M. C., Lewis, G. S. (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.

Wulster-Radcliffe, M. C., Wang, S., Lewis, G. S. (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.

Zarco, L, Stabenfeldt, G.H., Bosu, S., Bradford, G.E., Kindahl, H. (1988). Modification of PGF2 α synthesis and release in the ewe during the initial establishment of pregnancy. *Journal of Reproduction and fertility*, 83: 527-536.

Zobel, R., Taponen, J. (2014) Denaverine hydrochloride and carbetocin increased welfare during and after parturition and enhanced subsequent fertility in cattle. *Journal of Dairy Science*, 97: 3570-3577.



ACTA DE EXAMEN

CURSO: Defensa de Tesis de Maestría

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: Montevideo, 25 de marzo de 2019

Tribunal: Dra. Raquel Pérez (Presidente), Dr. Jorge Gil, Dra. Carolina Viñoles

CI ESTUDIANTE	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
4.530.649-9	CASURIAGA MALLMANN, Daniela	12	SSS

CON MENCIÓN

PRESENTADOS	NO PRESENTADOS	APROBADOS	APLAZADOS	INSCRIPTOS
1	0	1	0	1

TRIBUNAL

Dra. Raquel Pérez (Presidente)

Dr. Jorge Gil

Dra. Carolina Viñoles

FIRMA

[Signature of Dra. Raquel Pérez]

[Signature of Dr. Jorge Gil]

[Signature of Dra. Carolina Viñoles]

NOTA: Las calificaciones de aprobación de la Tesis de Maestría pueden ser:
B.B.B. – 6 , o S.S.S. – 12



FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS
DE MAESTRÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL

DILATACIÓN CERVICAL EN LA OVEJA: EFECTOS DE
TRATAMIENTOS CON ANÁLOGOS DE OXITOCINA Y DE
PROSTAGLANDINA E2 DE LARGA ACCIÓN

Por: Dra. Daniela Casuriaga Mallman
Director de Tesis: Dr. Marcelo Rodríguez Piñón
Codirectora de Tesis: Dra. Celia Tasende

Tribunal

Presidente: Dra. Raquel Pérez

Segundo Miembro: Dr. Jorge Gil

Tercer Miembro: Dra. Carolina Viñoles

Fallo del Tribunal:

- APROBADA CON MENCIÓN -

Salón de Posgrados
Martes 25 de marzo de 2019

El Fallo de aprobación de la Tesis puede ser: Aprobada (corresponde a la nota BBB- en el Acta), o Aprobada con Mención (corresponde a la nota SSS- 12 en el Acta)

rebut