

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**“EN BÚSQUEDA DE UN INDUCTOR FARMACOLÓGICO DE LA  
DILATACIÓN CERVICAL EN OVINOS: EFECTOS DEL FUROXANO, DE LA  
CARBETOCINA Y DEL DMSO EN EL MODELO DE EXPLANTES IN VITRO.”**

**Por**

DE CUBA BRUNO, Alina  
PAIVA FALCO, Andressa

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

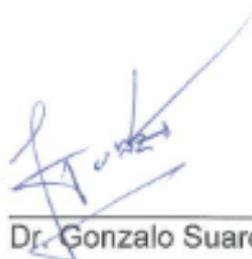
MODALIDAD: Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO,  
URUGUAY  
2021**

**PÁGINA DE APROBACIÓN**

Tesis de Grado aprobada por:

Presidente de Mesa:

  
\_\_\_\_\_

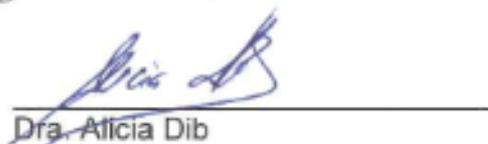
Dr. Gonzalo Suarez

Segundo Miembro (tutor):

  
\_\_\_\_\_

Dr. Rodríguez Piñón Marcelo

Tercer Miembro:

  
\_\_\_\_\_

Dra. Alicia Dib

Cuarto Miembro (co-tutor):

  
\_\_\_\_\_

Aux. Farm. Gonzalo García Barcelo

Fecha: 20/12/2021

Autores:

  
\_\_\_\_\_

Br. Alina De Cuba Bruno

  
\_\_\_\_\_

Br. Andressa Paiva Falco

## **AGRADECIMIENTOS**

Queremos brindar nuestros sinceros agradecimientos a nuestro tutor y co-tutor, Dr. Marcelo Rodríguez y Gonzalo García por la paciencia, dedicación, confianza y el respaldo brindado hacia nosotras. Ha sido un privilegio poder contar con su guía y ayuda. A la Dra. Ana Inés Aznares del frigorífico Nirea S.A. por proveer los tejidos utilizados en nuestro ensayo.

Agradecemos a todas esas personas que están y los que ya no están a nuestro lado, pero son parte del camino recorrido, por su apoyo incondicional. En especial a nuestros padres y hermanos que día a día nos acompañan, confiando en nosotras y esforzándose para que podamos llegar a la meta.

A la Facultad de Veterinaria por habernos permitido formar parte de ella y brindando las herramientas necesarias para nuestra formación como futuros profesionales, y al Área de Bioquímica por la ayuda brindada.

A nuestros compañeros y amigos por estar siempre, sea cual sea el motivo.

¡A todos muchas gracias!

## TABLA DE CONTENIDO

## PÁGINA

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	1
AGRADECIMIENTOS.....	2
LISTAS DE FIGURAS.....	4
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	10
Producción ovina en el Uruguay.....	10
Cérvix como barrera para la inseminación.....	10
Inducción de la dilatación cervical en ovinos.....	11
Liberadores de Óxido Nítrico.....	13
El Dimetilsulfóxido.....	13
HIPÓTESIS I.....	16
OBJETIVO I.....	16
Objetivo general.....	16
Objetivos Específicos.....	16
HIPÓTESIS II.....	16
OBJETIVO II.....	16
Objetivo general.....	16
Objetivos Específicos.....	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
Animales y tejidos.....	17
Experimento 1.....	17
Experimento 2.....	17
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	19
RESULTADOS.....	20
DISCUSIÓN.....	25
CONCLUSIONES.....	28
BIBLIOGRAFÍA.....	29

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Molde de silicona del canal cervical de la oveja adulta.....10
- Figura 2: Estructura química de un dimetilsulfóxido (DMSO) molécula.....14
- Figura 3: Distintos modos de acción de DMSO sobre membranas de fosfolípidos. Se presentan vistas laterales de las estructuras finales para los sistemas bicapa que contiene 0, 5, 10 y 40 % en moles de DMSO (base libre de lípidos). Los lípidos se muestran en cian, el agua en rojo y DMSO en amarillo.....15
- Figura 4: Actividad de la forma latente (L) de la MMP-2 (ng/mg tejido) en el sobrenadante de explantes de cérvix ovinos incubados por 12 h en medio MEM con Furoxano (Fx) en DMSO 2% en concentraciones crecientes (0, 0.03, 0.3, 3, 30 y 300 ug/mL) en presencia o no de Carbetocina (Cb) (100 ug/mL). Los controles se realizaron con medio de cultivo MEM y DMSO 2%. ( $P > 0.05$ ).....21
- Figura 5: Actividad de la forma activa (A) de la MMP-2 (ng/mg tejido) en el sobrenadante de explantes de cérvix ovinos incubados por 12 h en medio MEM y tratados con Furoxano (Fx) en DMSO 2% en concentraciones crecientes (0, 0.03, 0.3, 3, 30 y 300 ug/mL) en presencia o no de Cb (100 ug/mL). Los controles se realizaron con medio MEM y DMSO 2%. ( $P > 0.05$ ).....22
- Figura 6: Relación de la actividad de las MMP-2 (ng/mg tejido) de sus formas L y A en el sobrenadante de explantes de cérvix ovinos incubados por 12 h en medio MEM y tratados con Furoxano (Fx) en DMSO 2% en concentraciones crecientes (0, 0.03, 0.3, 3, 30 y 300 ug/mL) en presencia o no de Cb (100 ug/mL). Los controles se realizaron con medio MEM y DMSO 2%. ( $P > 0.05$ )..22
- Figura 7: Actividad de la forma latente (L) de la MMP-2 (ng/mg tejido) en el sobrenadante de explantes de cérvix ovinos incubados por 12 h en medio MEM con DMSO 2%, Cb(100 ng/mL) o Furoxano (Fx, 30 ug/mL). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0.0001$ ).....23
- Figura 8: Actividad de la forma activa (A) de la MMP-2 (ng/mg tejido) en el sobrenadante de explantes de cérvix ovinos incubados por 12 h en medio MEM con DMSO 2%, Cb(100 ng/mL) o Furoxano (Fx, 30 ug/mL). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0.0001$ ).....24
- Figura 9: Relación A/L de la actividad de las MMP-2(ng/mg tejido) en el sobrenadante de explantes de cérvix ovinos incubados por 12 h en medio MEM con DMSO 2%, Cb(100 ng/mL) o Furoxano (Fx, 30 ug/mL). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0.0001$ ).....24

## RESUMEN

La estrechez del cérvix de la oveja limita la inseminación artificial transcervical en esta especie. En la dilatación cervical participan enzimas que degradan la matriz extracelular (metaloproteinasas de la matriz extracelular o MMPs), en especial las MMP-2 y la MMP-9. La actividad de estas enzimas es dependiente de hormonas (estrógenos, oxitocina) y factores inflamatorios (prostaglandina E2, radicales libres), entre otros. La actividad de la MMP-2 aumentó en el sobrenadante de cultivo de explantes de cérvix ovino al estro en presencia de 100 ng/mL de Carbetocina (Cb, análogo sintético de la oxitocina) (Rodríguez Piñón y García-Barcelo 2019). El experimento propone la utilización de dosis crecientes de Furoxano (Fx, productor de óxido nítrico) en DMSO al 2% (pues no es soluble en agua), en presencia de Cb (100 ng/mL) por 12 hs para determinar la actividad enzimática por zimografía de las MMP-2 y MMP-9. Los resultados obtenidos manifestaron que no hubo aumento de la actividad de las MMPs respecto a los controles solo con DMSO, los que mostraron una elevada actividad de la MMP-2. Para obtener evidencias acerca del efecto del DMSO sobre la actividad de las MMP-2 y 9 en explantes de cérvix ovino, decidimos realizar un segundo experimento. Las muestras fueron incubadas en MEM (medio de cultivo, Control) suplementado con: DMSO (2%), DMSO (2%) +Cb (100 ng/mL) y DMSO (2%) + Fx (30 ug/mL) a 37°C por 12 h. En el sobrenadante se midió la actividad de las formas latente (L) y activada (A) de las MMP-2 y MMP-9 por zimografía en gelatina en SDS-PAGE, las que fueron analizadas por ANOVA (MixProc, SAS Institute, USA, 2000), considerando los factores fijos de tratamiento y zona cervical y sus interacciones. La actividad de L y A MMP-9 fue ocasional y esporádica en algunas pocas muestras. Mientras que la actividad de L y A de MMP-2 (ng/mg de tejido, mean±sem) aumentó en presencia de DMSO; y aumentó aún más en presencia de DMSO+Cb. En cambio, cuando la muestra fue expuesta al DMSO+Fx la actividad disminuyó con respecto a la obtenida en el tratamiento solo con DMSO. Los resultados muestran que el DMSO aumenta la liberación de L y A MMP-2 al medio de cultivo, probablemente por alteraciones en la permeabilidad de la membrana plasmática, es el mecanismo propuesto para el DMSO como criopreservante. Además, registramos un efecto aditivo en la asociación DMSO y Cb sobre la actividad de ambas formas de MMP-2, la que no se manifestó al asociar DMSO y Fx. En conclusión, los resultados sugieren que el DMSO podría ser investigado como agente inductor de la dilatación cervical en la oveja.

## SUMMARY

The narrowness of the cervix of the sheep limits transcervical artificial insemination in this species. Enzymes that degrade the extracellular matrix (extracellular matrix metalloproteinases or MMPs) participate in cervical dilation, especially MMP-2 and MMP-9. The activity of these enzymes is dependent on hormones (estrogens, oxytocin) and inflammatory factors (prostaglandin E2, oxygen free radicals), among others. The MMP-2 activity increased in the culture supernatant of ovine cervix explants at estrus in the presence of 100ng / mL of Carbetocin (Cb, synthetic analog of oxytocin) (Rodríguez-Piñón and García-Barcelo 2019). The experiment proposes the use of increasing doses of Furoxane (Fx, producer of nitric oxide) in 2% DMSO (since it is not soluble in water), in the presence of Cb (100 ng / mL) for 12 hours to determine the enzymatic activity of the MMP-2 and MMP-9. The results obtained showed that there was no increase in the activity of the MMPs compared to the controls only with DMSO, which showed a high activity of the MMP-2. To obtain evidence about the effect of DMSO on the activity of MMP-2 and 9 in ovine cervix explants, we decided to carry out a second experiment. The samples were incubated in MEM (culture medium, Control) supplemented with: DMSO (2%), DMSO (2%) + Cb (100ng / mL) and DMSO (2%) + Fx (30 ug / mL) at 37 ° C for 12 h. In the supernatant, the activity of the latent (L) and activated (A) forms of MMP-2 and MMP-9 was measured by gelatin zymography on SDS-PAGE, which were analyzed by ANOVA (Mix proc, SAS Institute, USA, 2000), considering the fixed factors of treatment and cervical area and their interactions. The activity of L and A MMP-9 was occasional and sporadic in a few samples. While the activity of L and A of MMP-2 (ng / mg of tissue, mean  $\pm$  sem) increased in the presence of DMSO; and increased even more in the presence of DMSO + Cb. On the other hand, when the sample was exposed to DMSO + Fx, the activity decreased with respect to that obtained in the treatment only with DMSO. The results show that DMSO increases the release of L and A MMP-2 to the culture medium, probably due to alterations in the permeability of the plasma membrane, it is the mechanism proposed for DMSO as a cryopreservative (Andrey A. Gurtovenkoy Jamshed Anwar 2007). Furthermore, we registered an additive effect of the association DMSO and Cb on the activity of both forms of MMP-2, which was not manifested when associating DMSO and Fx. In conclusion, the results suggest that DMSO could be investigated as an inducing agent for cervical dilation in sheep.

## INTRODUCCIÓN

La producción ovina es un rubro importante en el país, aunque el stock total del ganado ovino ha disminuido de unos veinticuatro millones y medio de cabezas en los años 90 a seis millones trescientos treinta y siete mil al año 2020 (MGAP, 2020). Para lograr un aumento de stock en poco tiempo y, a su vez, dirigir el potencial genético según la demanda del mercado, la inseminación artificial (IA) pasa a ser una de las herramientas reproductivas claves (Salomon y Maxwell, 2000).

Sin embargo, la IA en ovinos posee dos grandes limitantes. Una de ellas es la anatomía del cérvix ovino, que es compleja por ser pequeño, estrecho y poseer anillos que restringen la luz del canal cervical (Moré, 1984; Halbert, Dobson, Walton, Buckrell, 1990; Campbell, Harvey, McDonald y Sparksman, 1996; Kershaw et al., 2005), constituyéndose en una barrera fisiológica contra gérmenes patógenos que atentan contra la concepción. Por lo cual no se permite el paso transcervical de una pipeta inseminante para lograr la inseminación intrauterina (Salomon y Maxwell, 2000; Halbert et al. 1990, Kershaw et al., 2005). El otro inconveniente al cual nos enfrentamos es la baja fertilidad que presenta el semen de carnero congelado-descongelado, causada por la crioconservación (Salomon y Maxwell, 2000).

Existe una relación positiva entre el sitio de deposición del semen en el canal cervical de la oveja y la tasa de fertilidad lograda, pudiendo llegar a aumentos del 13% de fertilidad por cm de profundidad en la canulación transcervical (Eppleston, Salomon, Moore y Evans 1994). Se ha reportado que durante el estro ocurre cierto grado de dilatación natural del cérvix, el que sería promovido por la relación estrógenos (E)/progesterona (P) circulante (Halbert et al., 1990). El momento de máxima penetración cervical en el período preovulatorio coincide con altas concentraciones de estradiol (Falchi, Taema, La Clanche, Scaramuzzi, 2012), el cual aumenta la sensibilidad del cérvix a la Oxitocina (Ox), mediante aumento de sus receptores (Rodríguez-Piñón, 2015). A su vez, la Ox produce la liberación de prostaglandina E2 (PGE2) -un inductor de la dilatación cervical, al mucus cervical en la vaca (Fuchs, Graddy, Kowalski, Fields, 2002). Se ha sugerido, entonces, que ambas hormonas podrían ser responsables de la relajación del cuello uterino mediante cambios cualitativos y cuantitativos en la composición de la matriz extracelular cervical, desagregando y degradando activamente el colágeno, lo que produciría la dilatación del cérvix (Falchiet al. 2012; Rodríguez-Piñón, 2015).

La desagregación de las fibras de colágeno estaría vinculada a un aumento en el contenido de ácido hialurónico en el tejido cervical, inducido por la PGE2 en forma autocrina/paracrina por la mucosa cervical (Kershaw, Scaramuzzi, McGowan, Wheeler-Jones, Khalid, 2007; Rodríguez Piñón et al., 2014). La degradación de las fibras de colágeno cervical estaría vinculada a la actividad colagenasa de las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP) (Hulboy, Rudolph, Matrisian, 1997). Durante la fase folicular de la oveja, se ha reportado un aumento de la actividad cervical de la MMP-2 o colagenasa Tipo IV, pero no de la MMP-9 (Rodríguez-Piñón, 2015). En conjunto, las evidencias indican que

ocurre cierto grado de dilatación natural del cérvix de la oveja al momento del estro, que es promovido por la acción de los E. En el tejido cervical, la señal estrogénica se amplifica en forma autocrina y/o paracrina mediante el sistema Ox/PGE2. Ambas hormonas producirían cambios cuali y cuantitativos en la composición del conjuntivo cervical, desagregando y degradando activamente el colágeno, lo que produciría la dilatación cervical. .

Tratamientos con Ox y/o PGE2 han sido utilizados para dilatar el cérvix y facilitar su canulación (Owiny and Fitzpatrick, 1990; Sayre and Lewis, 1996 y 1997; Stellfluget al., 2001; King et al., 2004; Leethongdee, Kershaw-Young, Scaramuzzi, Khalid, 2010). Alternativamente a la administración de Ox natural, que tiene una vida media corta (15-30 minutos), se cuenta hoy en día con un análogo sintético Carbetocina(Cb, Decomoton; Laboratorios Calier, Uruguay) con una afinidad de la unión similar a la Ox natural (Engstrøm, Barth, Melin, Vilhardt, 1998) y una acción biológica que se prolonga por 12 horas (Bajcsy et al., .2006) y actuaría por un período de tiempo, compatible con el complejo mecanismo de cascada de señales descrito para desencadenar los procesos de remodelación del colágeno cervical (Rodríguez-Piñón, 2015). Los resultados mostraron que la Cb administrada 12 h antes del momento esperado de la IA (54 h post eCG), aumentó aproximadamente 1 cm la penetrabilidad cervical respecto a los animales no tratados (1.5 vs. 0.6 cm, respectivamente,  $P < 0.05$ ) (Casuriaga, 2019). Este aumento de la penetrabilidad cervical estuvo asociado a la activación de la MMP-2 y una disminución del colágeno cervical. Además, mediante estudios in vitro, la incubación de explantes cervicales por 12 h con Cb produjo la activación de la MMP-2 y un aumento de la relación activada/latente de la MMP-2 dependiente de la dosis de Cb (Rodríguez-Piñón y García-Barcelo, 2019).

Por otro lado, se ha encontrado que el óxido nítrico (NO) juega un rol dilatador del cérvix durante el parto en ratas, evidenciándose que la NO-sintasa (NOS) y su mRNA se incrementan en el cérvix entre el inicio del parto y la entrega de la primera cría (Buhimischi, Ali, Jain, Chwalisz, Garfield, 1996; Ali, Buhimischi, Chwalisz, Garfield, 1997). El NO puede inducir cambios en el tejido conectivo, por la estimulación de la síntesis de glucosaminoglicanos, de metaloproteinasas y de PGE2 vía ciclooxigenasa II (Garfield et al., 1998; Chwalisz and Garfield., 1996; Winklerand Rath, 1999), y estos procesos podrían tener lugar durante la dilatación cervical. Se han ensayado agentes capaces de liberar NO, tales como mononitrato de isosorbida, nitroprusiato de sodio y trinitrato de glicerina, solos o combinados con otros agentes, con resultados auspiciosos en su capacidad de dilatación cervical en humanos (Facchinetti, Piccinini, Volpe, 2000; Ledingham, Thomson, Lunan, Greer, Norman, 2001; Phusaanantakul, Promsonthi, Chanrachakul, 2010). No hemos encontrado trabajos que utilicen agentes liberadores de NO para dilatar el cérvix en ovejas.

En esta tesis, en primera instancia se trabajó con la Hipótesis de que el Fx, un agente liberador de NO que nuestro grupo ha estado estudiando en los últimos años (Ross et al., 2012; Dos Santos et al., 2012; Hernández et al., 2013; Cabrera, Mastandrea, Otero, Cerecetto, González, 2016), produce un aumento dosis-respuesta de la actividad de las MMP-2 y MMP-9 en explantes de cérvix

ovino en presencia de Cb (Hipótesis I). Para ello se diseñó un primer experimento, con el objetivo de obtener evidencias acerca del efecto de la administración de la Cb y el Fx sobre la actividad de las MMP-2 y -9. El Fx es un compuesto insoluble en agua, motivo por lo cual se utilizó el DMSO al 2% en el medio de cultivo. Los resultados de este primer experimento mostraron una posible interacción del DMSO con las variables de salida (actividad de las MMPs). A raíz de eso, se diseñó un segundo experimento, que tuvo como hipótesis que el DMSO al 2% produce un incremento en las MMP-2 y MMP-9 en explantes de cérvix ovino (Hipótesis II).

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

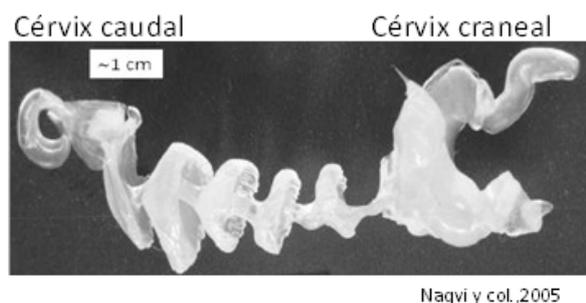
### Producción ovina en el Uruguay

Uruguay tiene una superficie total de 18,5 millones de hectáreas, de las cuales el 85% puede considerarse productivo y se utiliza principalmente para la agricultura y el pastoreo (Abella et al., 2010). La actividad ganadera (bovina y ovina) ocupa en torno al 75% del total de la superficie productiva del país, que representa aproximadamente 11 millones de hectáreas.

La producción ovina es un rubro importante, aunque el stock total del ganado ovino ha disminuido de unos veinticuatro millones y medio de cabezas en los años 90 a seis millones trescientos treinta y siete al año 2020 (MGAP, 2020). Para lograr un aumento de stock en poco tiempo y, a su vez, dirigir el potencial genético según la demanda del mercado, la IA pasa a ser una de las herramientas reproductivas claves (Salomon y Maxwell, 2000).

### Cérvix como barrera para la inseminación

El cérvix de la oveja es un órgano tubular y fibroso, de 5 a 10 cm de largo dependiendo de la raza, compuesto principalmente de tejido conectivo con predominio de colágeno y músculo liso (Moré, 1984). Su morfología interna se caracteriza por sus seis pliegues internos desalineados con respecto al primer pliegue. Estos parecen conos truncados que están directamente dirigidos hacia la vagina (RodríguezGavancho, Muscari, Sacsara, 2015). Hacia la luz, los pliegues de la mucosa forman 5 a 7 anillos excéntricos en forma de embudo con el vértice hacia caudal, que ocluyen la luz del canal cervical (Halbertet al., 1990; Kershawet al., 2005; Naqviet al., 2005).



*Figura 1: Molde de silicona del canal cervical de la oveja adulta. Naqviet al., 2005.*

Esta conformación anatómica particular constituye una barrera para la canulación transcervical, convirtiéndose en un factor limitante para el desarrollo de biotecnologías reproductivas como la IA (Halbertet al., 1990; Campbell et al., 1996). En el caso de ovinos el semen se deposita a la entrada del canal cervical, y en el mejor de los casos a 1 cm de profundidad. La tasa de parición obtenida después de la IA con semen congelado es baja debido a la incapacidad de los espermatozoides para atravesar la naturaleza tortuosa del

canal cervical (Eppleston y Maxwell, 1993). La compleja anatomía del cuello uterino no facilita el paso para un catéter de 14g de inseminación (Naqviet al., 2005; RodríguezGavanchonet al., 2015). Además, en la gran mayoría de las ovejas sólo es posible la IA en el orificio cervical caudal, resultando en bajos índices de concepción cuando se utiliza semen congelado (Salamon y Maxwell, 2000).

Se ha observado que la fertilidad aumenta proporcionalmente a la profundidad en que se realiza la deposición seminal en el canal cervical (IA cervical), a razón de un 7 a 12 % por cm (Eppleston et al., 1994) y es máxima cuando se hace directamente en la luz uterina (IA uterina) (Sayre, Lewis, 1997). El acceso al útero en forma transcervical es la alternativa que genera mayor expectativa (Salamon y Maxwell, 2000), para lo cual el cérvix constituye una barrera y un problema que debe ser resuelto.

### **Inducción de la dilatación cervical en ovinos**

Las estrategias desarrolladas para dilatar el cérvix ovino y acceder al útero trans cervicalmente incluyen la apertura física utilizando instrumental especial (Halbert et al., 1990; Wulster-Radcliffe, Wang, Lewis, 2004) y la inducción hormonal a la dilatación cervical (Rodríguez-Piñón, 2003 y 2006; Robinson et al., 2011; Candappa, Bartlewski, 2012). La primera ha mostrado producir efectos traumáticos negativos sobre la fertilidad (Campbell et al., 1996; Wulster-Radcliffe et al., 2004). La segunda está basada en el conocimiento de la fisiología de la dilatación del cérvix y se presenta como la opción más eficiente y menos costosa.

El ciclo estral es el resultado de una cadena de eventos coordinados fundamentalmente por cuatro órganos: cerebro, hipófisis, ovarios y útero, que establecen vías neuroendocrinas y endocrinas de comunicación coordinando la función reproductiva (Goodman, 1994). Está regulado por la interrelación entre las hormonas producidas por estos órganos: la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) del hipotálamo, la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) de la hipófisis, el estrógeno (E) y la inhibina de los folículos ováricos, la progesterona (P) y la oxitocina (Ox) del cuerpo lúteo y la prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) del útero (Goodman, 1994).

En ovinos, el ciclo estral tiene una duración promedio de 17 días que puede dividirse en una fase folicular y una fase luteal. La fase folicular es aquella que se extiende desde la luteólisis (día 14-15 del ciclo) hasta la ovulación (día 1) y se caracteriza por la presencia de un folículo ovulatorio que produce altas concentraciones de E y por el comportamiento estral (estro) que dura entre 24-36 horas (Goodman, 1994). En el día del estro (día 0) se produce el pico preovulatorio de LH y la ovulación ocurre aproximadamente a las 24 horas del mismo (Scaramuzziet al., 1993). La fase luteal se inicia con la ovulación y es caracterizada por el desarrollo del cuerpo lúteo, el aumento paulatino de las concentraciones circulantes de P y finaliza con la luteólisis (Goodman, 1994).

El cérvix se hace permeable en dos situaciones reproductivas particulares: al estro, permitiendo el ascenso de los espermatozoides y al parto, permitiendo el

descenso y la expulsión del feto (Heydon, Adams, 1979). Sufre cambios profundos durante el proceso de gestación y parto, basados especialmente en un activo metabolismo de su matriz extracelular, donde coexisten y se interrelacionan fenómenos moleculares y celulares, mayoritariamente descritos en la mujer y en roedores (Gorodeski, 1996; El Maradnyet al., 1997). La coordinación de estos fenómenos depende de los E y la P, actuando a través de sus receptores específicos (RE y RP, respectivamente) (Gorodeski, 1996; Stjernholmet al., 1996), directamente o a través de otras hormonas.

Se ha reportado que la penetrabilidad del cérvix ovino, medida con una cánula de IA, es mayor durante la fase folicular que en la fase luteal; sugiriendo que cierto grado de dilatación cervical al estro sería producto de los altos niveles de E y bajos de P (Kershawet al., 2005). La caracterización de RE y RP en cérvix ovino durante el ciclo estral, mostró mayores concentraciones de ambos receptores al estro (día 1) respecto a la fase luteal (días 6 y 13) y mayores en la zona caudal respecto a la zona craneal del cérvix (Rodríguez-Piñón, Tasende, Puime and Garófalo, 2008).

La dilatación cervical en la oveja al estro es favorecida por la activación de estrógeno dependiente del sistema Ox/PGE2. La activación del sistema Ox/PGE2 induce a la relajación del músculo liso y a la remodelación del colágeno cervical permitiendo la apertura del canal cervical al estro (Rodríguez-Piñón, 2015).

La degradación de las fibras de colágeno depende de la actividad de las colagenasas, que integran la familia de las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs) (Hulboyet al., 1997) compuesta por más de 20 tipos de isoenzimas que degradan los componentes de la matriz extracelular (MEC) y de la membrana basal de manera zinc-dependiente. Las MMPs son sintetizadas mayoritariamente bajo forma de pro-enzimas (forma latente, L) y luego secretadas a la matriz extracelular donde son activadas (forma activada, A) (Hulboy y col., 1997). El proceso de activación ocurre mediante proteólisis limitada llevada a cabo fundamentalmente por otras MMPs. 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 función de lo anterior, la Ox y la PGE han sido utilizadas para dilatar el cérvix y facilitar su canulación, administradas solas (Stellfluget al. 2001; Kinget al. 2004) o combinadas (Leethongdeeet al. 2007; De Rossi et al. 2009; Falchiet al. 2012). Considerando la vida media corta de la Ox (minutos), se desarrolló un análogo sintético de larga duración (12 horas), la Carbetocina (Cb). Presenta una actividad de unión al receptor de Ox similar al natural, pero tiene una vida media de 4 a 10 veces más prolongada que la Ox natural (Atke y Vilhardt, 1987). Esto podría asegurar un efecto oxitócico lo suficientemente largo para desencadenar los procesos de dilatación cervical sin necesidad de usar dosis repetidas o altas dosis suprafisiológicas de Ox natural que posiblemente interfieran en la fertilidad. Además, se ha reportado que la

Carbetocina posee una menor actividad uterotónica que la Ox natural (Atke and Vilhardt., 1987; Engstrøm y col., 1998), por lo que la administración de Carbetocina podría ser una alternativa al uso de la Ox natural en la inducción de la dilatación cervical en ovejas.

Según estudios realizados, mostraron que la Cb administrada 12 horas antes del momento esperado de la IA (54 h post eCG), aumentó aproximadamente 1 cm la penetrabilidad cervical respecto a los animales no tratados (1.5 y 0.6 cm, respectivamente,  $P < 0.05$ ) (Casuriaga, 2019). Este aumento de la penetrabilidad cervical estuvo asociado a la activación de la MMP-2 y una disminución del colágeno cervical. Además, mediante estudios *in vitro*, la incubación de explantes cervicales por 12 h con Cb y PGE2 produjo la activación de la MMP-2 y un aumento de la relación activada/latente de la MMP-2 dependiente de la dosis de Cb (Rodríguez-Piñón y García-Barcelo 2019). En conjunto, los resultados sugieren que la utilización de la Cb como inductor de la dilatación cervical es una alternativa a investigar.

### **Liberadores de Óxido Nítrico**

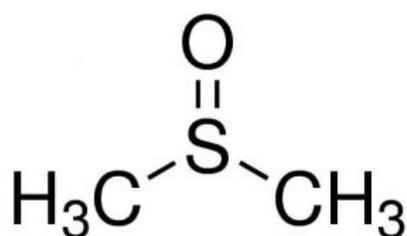
Por otro lado, se ha encontrado que el óxido nítrico (NO) juega un rol dilatador del cérvix durante el parto en ratas, evidenciándose que la NO-sintetasa (NOS) y su mRNA se incrementan en el cérvix entre el inicio del parto y la entrega de la primera cría (Buhimishiet al., 1996; Ali et al., 1997). El NO puede inducir cambios en el tejido conectivo, por la estimulación de la síntesis de glucosaminoglicanos, de metaloproteinasas y de PGE2 vía ciclooxygenasa II (Garfield et al., 1998; Chwalisz and Garfield, 1998; Winkler et al., 1999; Winkler and Rath, 1999), y estos procesos podrían tener lugar durante la dilatación cervical. No hemos encontrado trabajos que utilicen agentes liberadores de NO para dilatar el cérvix en ovejas. Por otro lado, se han ensayado agentes capaces de liberar NO, tales como mononitrato de isosorbida, nitroprusiato de sodio y trinitrato de glicerina, solos o combinados con otros agentes, con resultados auspiciosos en su capacidad de dilatación cervical en humanos, (Facchinettiet al., 2000; Ledinghamet al., 2001; Phusaanantakulet al., 2010). Sin embargo, uno de los sistemas liberadores de NO que nuestro grupo ha estado estudiando en los últimos años, los sistemas furoxanos, (Ross et al., 2012; Dos Santos et al., 2012; Hernández et al., 2013; Cabrera et al., 2016) no han sido utilizados para este propósito. El NO es un importante mensajero implicado en una amplia gama de funciones biológicas, incluyendo control del tono vascular, inhibición plaquetaria, adhesión celular, neurotransmisión, erección del pene, regulación de las enzimas, y regulación inmunológica (Medanaet al., 1994).

El furoxano (óxido de furazán; 2-óxido de 1,2,5-oxadiazol) es un sistema simple enigmático e intrigante. Resultados recientes han demostrado que derivados del furoxano son capaces de activar el guanilato soluble, liberando NO bajo la acción del cofactor tiol (Medanaet al., 1994). El 4-fenil-3-furoxancarbonitrilo es una formulación con gran capacidad para liberar grandes cantidades de NO (Medanaet al., 1994). El mecanismo de liberación de óxido nítrico por derivados del furoxano es un tema que necesita una investigación exhaustiva. Por el

momento, sólo un mecanismo especulativo de NO ha producido liberación de furoxancarboxamidas (Medanaet al., 1994)

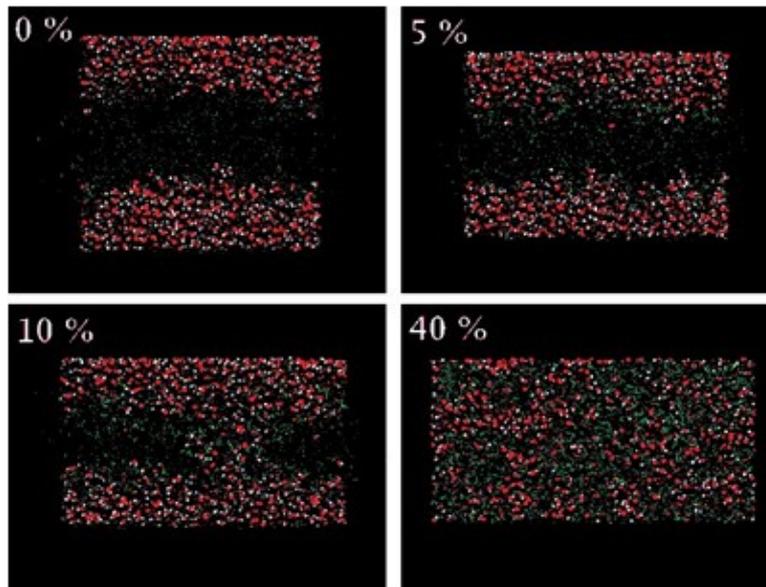
### **El Dimetilsulfóxido**

El dimetilsulfóxido (DMSO) es una pequeña molécula anfipática con un grupo sulfóxido hidrofílico y dos grupos metil hidrofóbicos. Se emplea ampliamente en biología celular como eficaz potenciador de la penetración, fusógeno celular y crioprotector (Notmanet al., 2006). Su naturaleza anfifílica parece ser una importante característica definitoria de su acción sobre las membranas (Gurtovenko, Anwar, 2007).



*Figura 2. Estructura química de un dimetilsulfóxido (DMSO)*

En un estudio realizado sobre el mecanismo molecular de la interacción del DMSO con las membranas de fosfolípidos, realizado a escala atómica, se observó que el DMSO exhibe tres modos de acción distintos, dependiendo de la concentración. A bajas concentraciones (2.5 - 7.5 mol%), el DMSO induce el adelgazamiento de la membrana y aumenta la fluidez de los núcleos hidrofóbicos. En dosis más altas (10 - 20 mol%), el DMSO induce a la formación de poros de agua transitorios en la membrana. A concentraciones aún mayores (25 - 100 mol%), las moléculas de lípidos individuales se desbordan de la membrana, desintegrándose la estructura de la bicapa lipídica (Gurtovenko, Anwar, 2007). Entonces, el DMSO provoca que la membrana se vuelva más débil, lo que aumenta la permeabilidad.



*Figura 3. Distintos modos de acción de DMSO sobre membranas de fosfolípidos. Se presentan vistas laterales de las estructuras finales para los sistemas bicapa que contiene 0, 5, 10 y 40% en moles de DMSO (base libre de lípidos). Los lípidos se muestran en cian, el agua en rojo y DMSO en amarillo (Notman, Noro, O'Malley, Anwar, 2006).*

Las moléculas de DMSO parecen residir justo debajo de la región del grupo de cabeza y actúan como espaciadores / pivotes que aumentan la separación lípido-lípido, permitiendo que la bicapa adopte fácilmente una forma curva para adaptarse a cualquier estrés. Este mecanismo de acción puede ser una característica general de pequeñas moléculas anfipáticas que incluyen alcoholes de cadena corta. A altas concentraciones, DMSO ha sido observado para inducir poros de agua en la membrana, que podría ser un posible mecanismo de acción para la permeabilidad de la membrana, mejora particularmente a moléculas hidrófilas (Notman et al., 2006).

## **HIPÓTESIS I**

Dosis crecientes de Fx producen un aumento en la actividad de las MMP-2 y MMP-9 en explantes de cérvix ovino en presencia de Cb.

## **HIPÓTESIS II**

DMSO al 2% produce un aumento de la actividad de las MMP-2 y MMP-9 en presencia de Cb o Fx en explantes de cérvix ovino.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto de la administración de Fx y DMSO en presencia o no de Cb sobre la actividad de las MMP-2 y -9, para aportar al desarrollo de la inducción de la dilatación hormonal del cérvix ovino.

### **Objetivos específicos Experimento I**

- 1- Determinar el efecto *in vitro* de la administración de dosis crecientes de Fx en presencia de Cb por 12hs, sobre la actividad de las formas latente y activa de la MMP-2 en explantes de cérvix craneal y caudal y de ovejas ciclando.
- 2- Determinar el efecto *in vitro* de la administración de dosis crecientes de Fx en presencia de Cb por 12hs, sobre la actividad de las formas latente y activa de la MMP-9 en explantes de cérvix craneal y caudal de ovejas ciclando.

### **Objetivos específicos Experimento II**

1. Determinar el efecto *in vitro* de la administración de DMSO al 2% en presencia o no de Cb o Fx, sobre la actividad de las formas latente y activa de la MMP-2 en explantes de cérvix craneal y caudal ovino.
2. Determinar el efecto *in vitro* de la administración de DMSO al 2% en presencia o no de Cb o Fx, sobre la actividad de las formas latente y activa de MMP-9 en explantes de cérvix craneal y caudal ovino.
- 3.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Animales y tejidos**

Los ensayos se realizaron en el Laboratorio de la Unidad Académica de Bioquímica de la Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay, del 22 de mayo al 30 junio de 2020 (Exp 1) y entre el 2 al 30 de agosto de 2020 (Exp 2).

Se utilizaron tractos reproductivos de ovinos obtenidos del frigorífico Nirea S.A. (San Jacinto, situado en Ruta 7 km 59.500 Canelones, Uruguay).

Se observaron dichos tractos, para determinar la etapa del ciclo estral en la que se encontraban las ovejas. En ambos experimentos se disecaron los cervices, dividiéndolos en tercios y denominando cérvix craneal al tercio contiguo al útero y caudal al contiguo a la vagina. Cada fracción (aprox. 300 mg) fue laminada con bisturí y cada lámina fue pesada y colocada en pocillos de una placa de cultivo con medio MEM a 37°C por 12 horas.

### **Experimento 1**

Detectamos solamente en diestro (n=8), las cuales presentaban cuerpo lúteo evidente, con secreción cérvico/vaginal escasa y pegajosa.

Las zonas craneal y caudal se incubaron en medio MEM (2 mL) con concentraciones crecientes de Fx (0, 0.03, 0.3, 3, 30 y 300 µg/mL) sintetizado por nuestro equipo y diluido en 2% de DMSO, en presencia de Cb (100 ng/mL, Decomoton, Laboratorios Calier, Uruguay). Se realizaron controles de Fx 300 ug/mL sin Cb y control sin tratamiento (solo DMSO 2%).

### **Experimento 2**

Las zonas craneal y caudal del cérvix de 5 ovejas en anestro (n=5) se incubaron en medio MEM (2 mL), suplementado con: DMSO (2%), DMSO (2%) + Cb (100 ng/mL) y DMSO (2%) + Fx (30 ug/mL).

## MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

En los sobrenadantes de cultivo de todas las muestras de ambos experimentos, se midió la actividad de las formas latente (L) y activada (A) de las MMP-2 y MMP-9. La determinación de la actividad gelatinolítica se realizó por zimografía en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, 7,5% de poliacrilamida) co-polimerizado con gelatina (2,5 mg/ml; G 9391; Sigma), como se describió para cérvix de oveja (Rodríguez-Piñón et al., 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 de sodio (SDS) y 0,0025% azul de bromofenol (pH= 7,6) y posteriormente las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta que se realizaron las corridas electroforéticas. Antes de cada corrida electroforética, se incubaron las muestras a 37 °C por 1 hora para facilitar la homogeneización de las muestras diluidas en SDS. Se sembraron 10 µL de cada muestra y las corridas electroforéticas se realizaron a 120V por 2 horas. Luego los geles se lavaron e incubaron en buffer 50-mM Tris/HCl (5 mM de CaCl<sub>2</sub>, 200 mM de NaCl, and 0,005% Brij 35, Sigma, pH 7.8) por 24 horas a 37°C para reconstituir la actividad enzimática. Se procedió con el teñido de los geles con Azul de Comassie R-250 al 1% y su desteñido. La actividad enzimática de L y A 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 se analizaron mediante el software ImageJ 1.46r usando el menú Analyze->Measure para medir el área y el número de píxeles por cada banda que luego se convirtieron a unidades estándares usando la función Set Scale (Rodríguez-Piñón et al., 2015). Calculamos la concentración de las formas latente y activa de las MMP-2 y MMP-9 de las muestras en función de curvas de calibración preparadas a partir de estándares recombinantes humanos (M9445, Sigma; 0,02–1 ng/ mL,  $r = 0,9744$  y  $r = 0,9913$  para la forma latente y activada de la MMP-2 respectivamente,  $P = 0,0001$ ), las que fueron expresadas en ng/mg de tejido.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Los datos de la actividad de las formas latente y activa de la MMP-2 y de la MMP-9 y la relación activada/latente se analizaron por ANOVA (Mixproc, StatisticalAnalysisSystems SAS Institute, USA, 2000), considerando los como efectos fijos el tratamiento y la zona cervical y sus interacciones. Los datos están presentados como medias  $\pm$  s.e.m., con diferencias consideradas significativas para  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS

En ambos experimentos, la actividad de las formas L y A en el caso de la MMP-9, fue ocasional y esporádica (3 de 16 en el Exp 1 y 2 de 8 en el Exp 2), representada en los gels como bandas pequeñas y tenues.

### Experimento 1

No hubo efectos del tratamiento ni de la zona cervical sobre las formas L (Figura 4) y A (Figura 5) de la MMP-2, ni sobre la relación A/L (Figura 6) ( $P>0.05$ ).

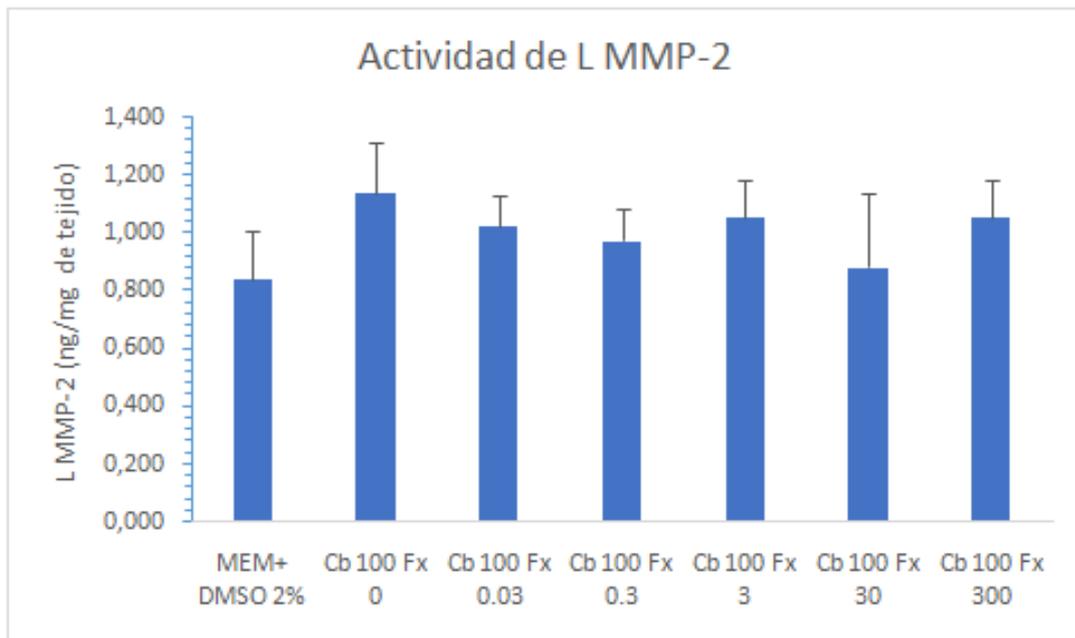


Figura 4: Actividad de la forma latente (L) de la MMP-2 (ng/mg tejido) en sobrenadante de explantes de cervix ovinos ( $n=8$ ) incubados por 12 h en medio MEM con DMSO 2% y tratados con Furoxano (Fx) en concentraciones crecientes (0, 0.03, 0.3, 3, 30 y 300  $\mu\text{g/mL}$ ) en presencia o no de Cb (100  $\mu\text{g/mL}$ ). No hubo diferencias entre los distintos tratamientos ( $P>0.05$ ).

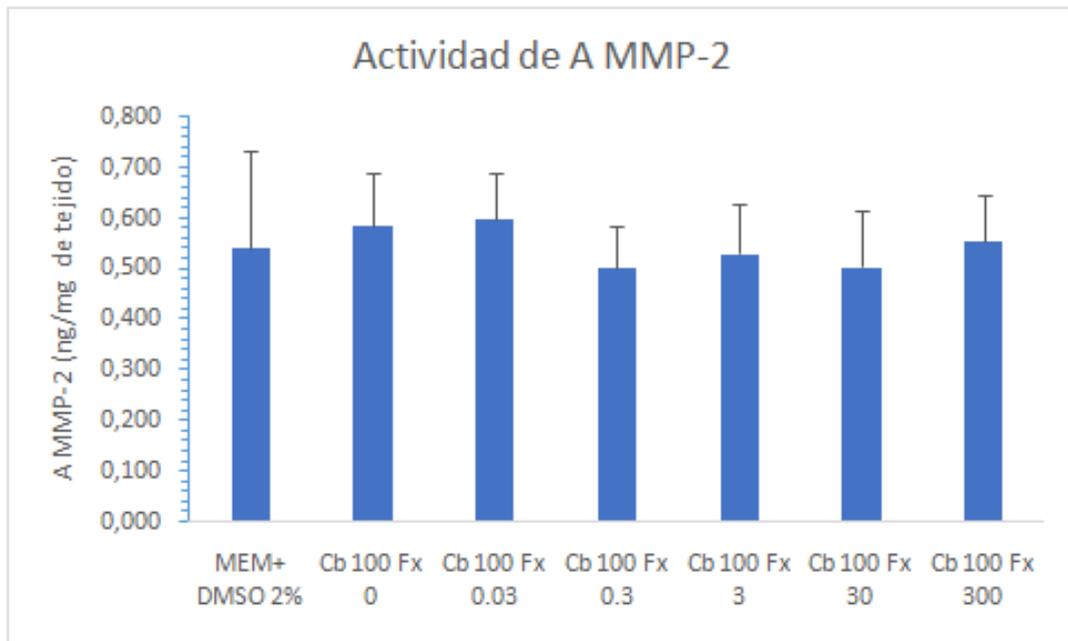


Figura 5: Actividad de la forma activa (A) de la MMP-2 (ng/mg tejido) en el sobrenadante de explantes de cervix ovinos (n=8) incubados por 12 h en medio MEM con DMSO 2% y tratados con Furoxano (Fx) en concentraciones crecientes (0, 0.03, 0.3, 3, 30 y 300 ug/mL) en presencia o no de Cb (100 ug/mL). No hubo diferencias entre los distintos tratamientos ( $P>0.05$ ).

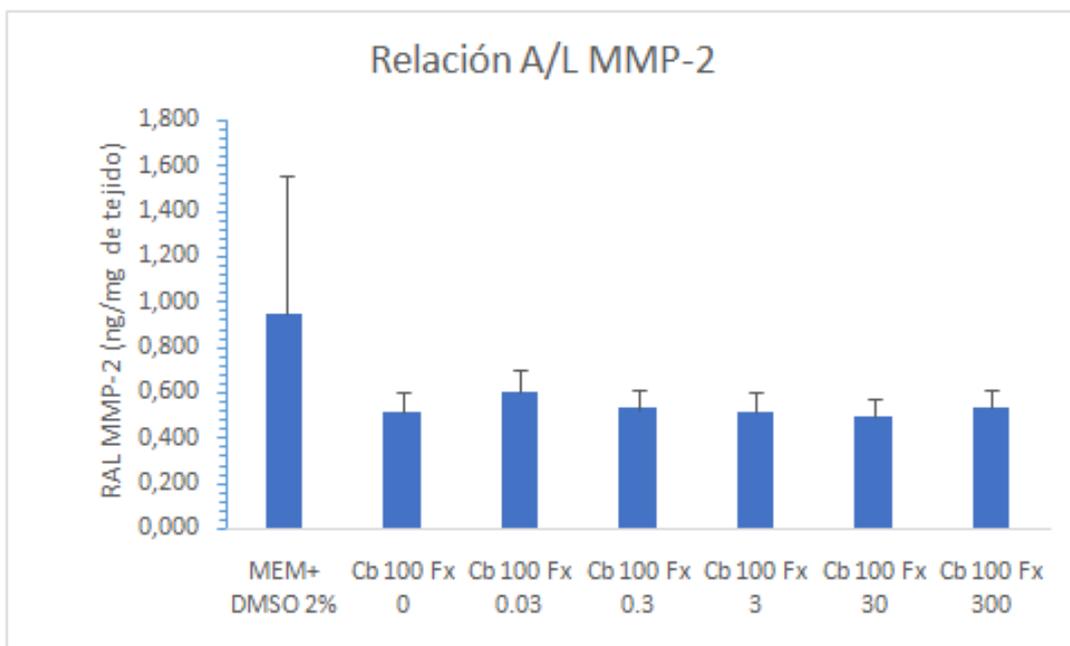


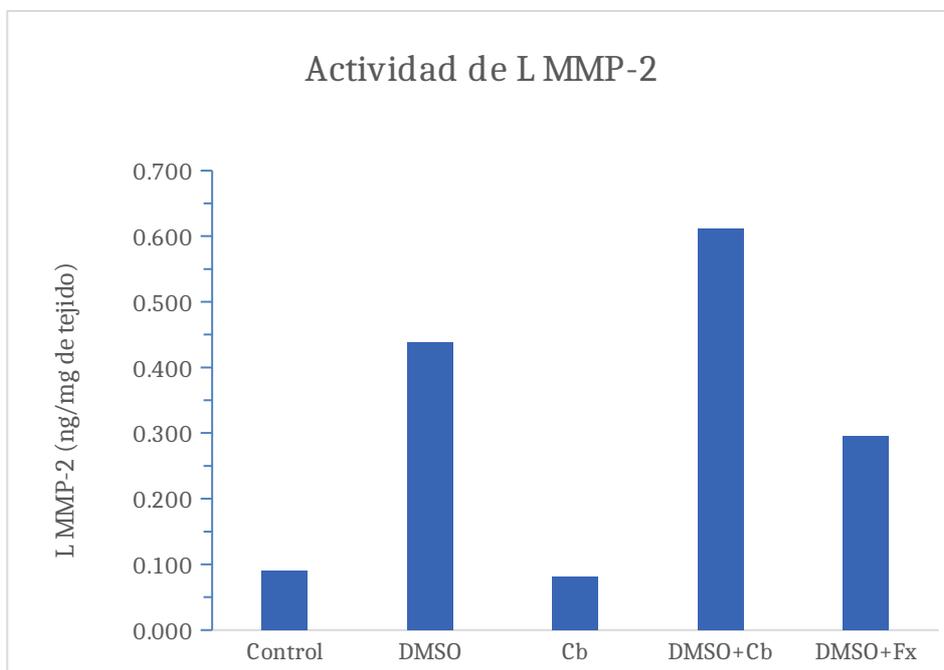
Figura 6: Relación de la actividad de las MMP-2 (ng/mg tejido) de sus formas L y A en el sobrenadante de explantes de cervix ovinos incubados por 12 h en medio MEM con DMSO 2% y tratados con Furoxano (Fx) en concentraciones crecientes (0, 0.03, 0.3, 3, 30 y 300 ug/mL) en presencia o no de Cb (100 ug/mL). No hubo diferencias entre los distintos tratamientos ( $P>0.05$ ).

## Experimento 2

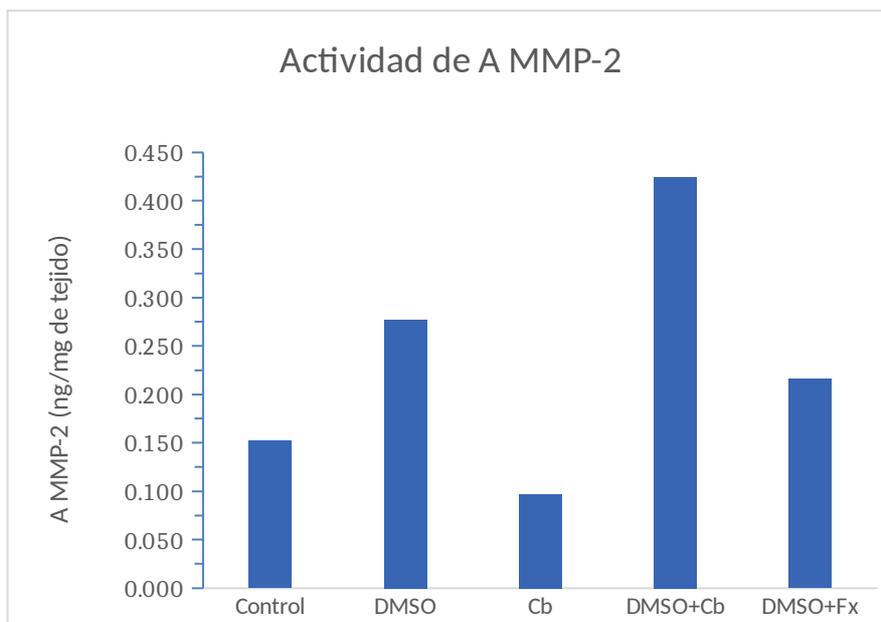
Hubo efecto del tratamiento ( $P < 0.0001$ ) en la actividad de L y A y en la relación A/L de MMP-2.

La actividad de L y A de MMP-2 (ng/mg de tejido, mean $\pm$ sem) aumentó en presencia de DMSO (Figuras 7 y 8). No hubo efecto de la Cb sola sobre las formas L y A de la MMP-2, pero la combinación Cb y DMSO produjo un aumento de la actividad de ambas formas por encima de los tratamientos simples (Cb solo y DMSO solo) (Figuras 7 y 8).

No hubo efecto del Fx sobre la actividad de L y A MMP-2 en presencia de DMSO (Figuras 7 y 8).

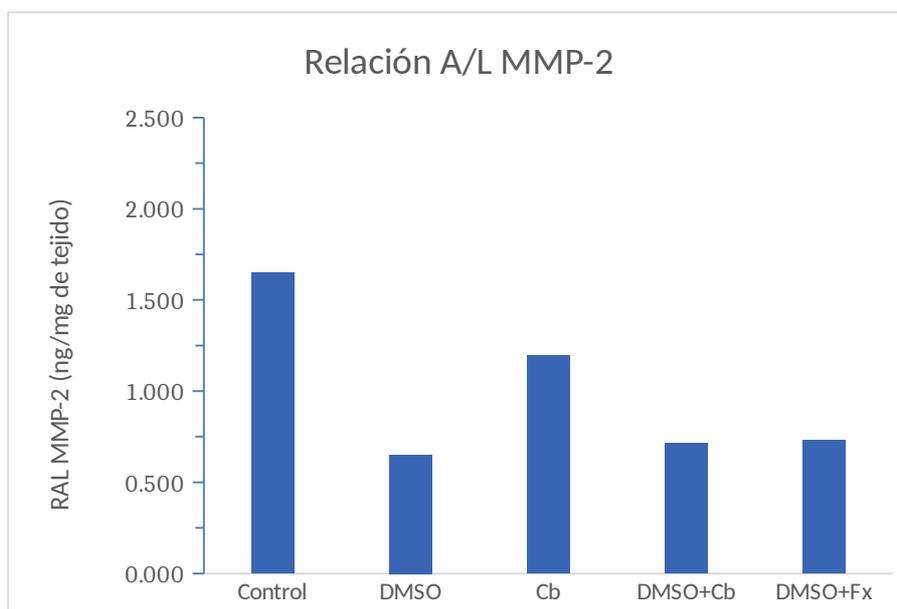


*Figura 7: Actividad de la forma latente (L) de la MMP-2 (ng/mg tejido) en el sobrenadante de explantes de cervix ovinos (n=5) incubados por 12 h en medio MEM con DMSO 2%, Carbetocina (Cb, 100 ng/mL) o Furoxano (Fx, 30 ug/mL). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0.0001$ ).*



**Figura 8:** Actividad de la forma activa (A) de la MMP-2 (ng/mg tejido) en el sobrenadante de explantes de cervix ovinos (n=5) incubados por 12 h en medio MEM con DMSO 2%, Carbetocina (Cb, 100 ng/mL) o Furoxano (Fx, 30 ug/mL). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0.0001$ ).

La relación A/L de MMP-2 disminuyó en presencia de DMSO, independientemente del tratamiento con Cb o Fx (Figura 9).



**Figura 9:** Relación de la actividad de las MMP-2 (ng/mg tejido) de sus formas L y A en el sobrenadante de explantes de cervix ovinos incubados por 12 h en medio MEM con DMSO 2%, Carbetocina (Cb, 100 ng/mL) o Furoxano (Fx, 30 ug/mL). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0.0001$ ).

La interacción tratamiento-zona cervical se manifestó solo en el tratamiento con DMSO+Fx, donde la actividad de L y A MMP-2 (ng/mg tejido) fue menor en la

zona craneal ( $0,146 \pm 0,037$  y  $0,108 \pm 0,035$ , respectivamente) que en la caudal ( $0,444 \pm 0,066$  y  $0,324 \pm 0,093$ , respectivamente) ( $P < 0.03$ ).

## DISCUSIÓN

En nuestros experimentos hubo una detección ocasional y esporádica en la actividad de las formas L y A de la MMP-9. Esto coincide con la detección de esta enzima en el cérvix de la oveja durante el ciclo estral, durante el ciclo inducido en el anestro estacional y prepúber (Rodríguez-Piñón 2015 y 2019). Estos datos refuerzan la idea de que la actividad gelatinasa en el cérvix de la oveja no preñada es ejercida predominantemente por MMP-2. Adicionalmente, la MMP-2 fue localizada por inmunohistoquímica en los fibroblastos activos, mientras que la MMP-9 en células de respuesta inmuno/inflamatoria en cérvix (Rodríguez-Piñón et al. 2015 y en humano (Stygaret al. 2002). La escasa actividad de la MMP-9 y su asociación con procesos de tipo inmune o inflamatorios, sugiere que este tipo de procesos no son predominantes en las modificaciones de la matriz extracelular cervical en ovejas vacías y corderas (Rodríguez-Piñón 2015, y 2019). En nuestro modelo in vitro, era esperable una escasa actividad de la MMP-9, dado que el desencadenamiento de procesos inflamatorios en explantes estaría detenido. En este modelo, tampoco los tratamientos con Cb, Fx o DMSO modificaron la actividad de la MMP-9, pero no se podría asegurar que esto mismo pase en el modelo in vivo, donde la administración local de los tratamientos podría inducir una respuesta inflamatoria y las condiciones para un incremento en la actividad de MMP-9.

En el experimento 1, no hubo efectos del tratamiento con Fx sobre la expresión de las MMP-2, tanto sobre la forma L como sobre la A, cuando en el medio había DMSO al 2%. Ninguna de las diluciones de Fx en DMSO 2% y Cb de utilizadas, produjo modificaciones en la actividad de L y A MMP-2, respecto a los controles con MEM y DMSO 2%. Tanto para la forma A, como la L de la MMP-2, los controles con MEM y DMSO 2% mostraron una actividad entre dos y tres veces superior a los controles de experimentos previos, donde no se había utilizado DMSO, para las formas L y A MMP-2, (Rodríguez-Piñón y García-Barcelo 2019). Este hecho nos hizo suponer que el DMSO estaría aumentando la actividad de estas enzimas y solapando el efecto del Furoxano. Estos resultados nos dan indicio para diseñar un segundo experimento.

El experimento 2 se basó en la hipótesis que el DMSO al 2% produce un incremento en las MMP-2 y MMP-9 en explantes de cérvix ovino. Detectamos que el agregado de DMSO 2% al MEM aumentó la actividad de las formas L y A de MMP-2. Este resultado fue un hallazgo inesperado para nosotros. No se encuentra reportado en la bibliografía el efecto del DMSO sobre la actividad de estas enzimas en el cérvix de ninguna especie, ni sobre otros tejidos. Este efecto puede deberse a la acción del DMSO sobre las membranas celulares. El DMSO provoca que la membrana se vuelva más débil y flexible, aumentando la permeabilidad celular, lo que facilita la fusión en procesos biológicos (Notmanet al., 2006). Ayuda a la formación de poros, lo que reduce la barrera para el transporte molecular (Notmanet al., 2006), permitiendo el pasaje de estas enzimas (MMP-2 y MMP-9) a través de la membrana celular.

Según los datos obtenidos en este experimento, ninguna de las formas de la MMP-2 fue afectada por el agregado de Cb (MEM vs. MEM+Cb). Esto

contrasta con experimentos previos, donde la Cb aumentó la actividad de la MMP-2, fundamentalmente a expensas de la forma A tanto in vivo (Casuriaga 2019), como in vitro (Rodríguez-Piñón y García Barcelo 2019). Esta discordancia podría deberse a que las muestras cervicales usadas en los experimentos previos fueron obtenidas de animales tratados al momento de la IA, 42 h luego de un tratamiento de sincronización de la ovulación en base a progesterona y eCG y las muestras del presente experimento derivaron de ovejas en anestro estacional. Los resultados sugieren que el efecto de la Cb sobre la actividad de la MMP-2 es dependiente de un entorno hormonal a predominio de los estrógenos (fase folicular). La ausencia del efecto de la Cb en nuestro experimento con ovejas en anestro, probablemente sea debida a los bajos niveles de receptores de oxitocina cervicales, al no ejercerse la regulación positiva que los estrógenos producen sobre ellos (Matthews y Ayad, 1994). Sin embargo, la combinación Cb y DMSO (MEM+DMSO+Cb) produjo un aumento de la actividad de ambas formas (L y A) por encima de sus respectivos controles (MEM+DMSO o MEM+Cb), sugiriendo que el efecto de la Cb sobre la MMP-2 pudo manifestarse en presencia de DMSO. El efecto positivo de la Cb en presencia de DMSO, sobre la actividad de la MMP-2 se ejerció con igual proporción en ambas formas A y L. De hecho, la relación A/L no fue distinta entre los grupos MEM+DMSO y MEM+DMSO+Cb. Esto contrasta con un incremento mayor en la actividad de la forma A respecto a la L luego de la incubación con Cb en explantes de ovejas durante la fase folicular (Rodríguez-Piñón y García Barcelo 2019). Además, en nuestro experimento, el tratamiento solo con Cb alteró la RAL, disminuyéndola (MEM vs MEM+Cb). Estas discordancias aparentes podrían deberse al entorno hormonal distinto entre ambos experimentos, sugiriendo que en nuestro modelo de ovejas en anestro, la Cb estaría estimulando la actividad de la MMP-2 por un mecanismo distinto a de la activación de la forma L, como fue propuesto para la oveja en fase folicular (Casuriaga 2019; Rodríguez-Piñón y García Barcelo 2019), el cual estaría facilitado por la salida de la L MMP-2 de las células bajo el efecto del DMSO sobre la permeabilidad de la membrana.

No hubo efecto del Fx sobre la actividad de L y A MMP-2 en presencia de DMSO. Al igual que en el primer experimento el efecto del Fx se ve solapado por el efecto del DMSO. Si lo comparamos con el grupo control observamos un aumento en la actividad de ambas formas de la MMP-2, pero es inferior al grupo tratado solo con DMSO (sin Fx). En nuestras condiciones experimentales, no podemos detectar el efecto del Fx *per se* sobre la actividad de las MMP evaluadas, y se precisarán más experimentos donde el Fx sea disuelto en otros solventes que no interaccionen con la actividad de las enzimas a través del tejido.

La relación A/L de MMP-2 disminuyó en presencia de DMSO, independientemente del tratamiento con Cb o Fx. Esto podría deberse al mecanismo de acción del DMSO, mencionado anteriormente. De todas formas, no solo aumentó la forma L, que es intracelular, sino también la A, que se activa en matriz extracelular. La RAL disminuye porque aumentó más la L que la A. Esto sugiere que la fuga de la L MMP-2 de la célula al exterior celular estaría acompañada también de un incremento, proporcionalmente menor, de la

activación de la enzima. Al haber más enzima L MMP-2 en la matriz extracelular, aumentan también las A MMP-2 por el proceso de activación.

En conjunto de ambos experimentos, nos sorprende que el compuesto a estudiar en un principio (Furoxano) no haya obtenido los efectos que esperábamos, pero si los obtuvimos con el diluyente (DMSO).

## **CONCLUSIONES**

En nuestro primer experimento no pudimos obtener evidencias de que el Furoxano esté afectando la actividad de estas enzimas, probablemente debido a que, al disolverlo en DMSO, este interactúa con el potencial efecto del Furoxano, quedando enmascarado.

Con nuestro segundo experimento concluimos que el DMSO aumenta la liberación de L y A MMP-2 al medio de cultivo, probablemente por alteraciones en la permeabilidad de la membrana plasmática. Además, registramos un efecto aditivo de la asociación DMSO y Cb sobre la actividad de ambas formas de MMP-2, la que no se manifestó al asociar DMSO y Fx.

Los resultados obtenidos sugieren que el DMSO podría ser investigado como agente inductor de la dilatación cervical en la oveja.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abella I, Cardellino RC, Mueller JP, Cardellino R, Benítez D and Lira R. (2010). South American Sheep and Wool Industries. En: Cottle DJ (Ed.) *International Sheep and Wool Handbook* (pp. 85-94). Nottingham University Press, UK.
- Ali M, Buhimschi I, Chwalisz K, Garfield RE. (1997) Changes in expression of the nitric oxide synthase isoforms in rat uterus and cervix during pregnancy and parturition. *Human Reproduction*, 3(11), 995-1003.
- Atke A, Vilhardt H. (1987). Uterotonic activity and myometrial receptor affinity of 1-deamino-1-carba-2-tyrosine(O-methyl)-oxytocin. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 115(1), 155-160.
- Bajcsy AC, Szenci O, van der Weijden GC, Doornenbal A, Maassen F, Bartyik J, Taverne MAM. (2006). The effect of a single oxytocin or carbetocin treatment on uterine contractility in early postpartum dairy cows. *Theriogenology*, 65(2), 400-414.
- Buhimisch I, Ali M, Jain V, Chwalisz K, Garfield RE. (1996). Pregnancy: Differential regulation of nitric oxide in the rat uterus and cervix during pregnancy and labour. *Human Reproduction*, 11(8), 1755-1766.
- Cabrera M, Mastandrea I, Otero G, Cerecetto H, González M. (2016). In vivo phase II-enzymes inducers, as potential chemopreventive agents, based on the chalcone and furoxan skeletons. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 24(8), 1665-1674.
- Campbell J.W., Harvey T.G, McDonald M.F. y Sparksman R.I. (1996). Transcervical insemination in sheep an anatomical and histological evaluation. *Theriogenology*, 45(8), 1535-1544.
- Candappa IB, Bartlewski PM. (2012). A review of advances in artificial insemination (AI) and embryo transfer (ET) in sheep, with the special reference 44 to hormonal induction of cervical dilation and its implications for controlled animal reproduction and surgical techniques. *The Open Reproductive Science Journal*, 162-175.
- Casuriaga D. (2019). *Dilatación cervical en la oveja: efectos de tratamientos con análogos de oxitocina y prostaglandina E2 de larga acción*(Tesis de Maestría). Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo.
- DeRossi R, Carneiro RPB, Ossuna MR, Zanenga NF, Alves OD, Jorge TP, Costa-e-Silva EV, Vasconcelos J. (2009). Sub-arachnoid ketamine administration combined with or without misoprostol/oxytocin to facilitate cervical dilation in ewes: A case study. *Small Ruminant Research*, 83(1-3), 74-78.
- Dos Santos JL, Lanaro C, Chelucci RC, Gambero S, Bosquesi PL, Reis JS, Lima LM, Cerecetto H, González M, Costa FF, Chung MC. (2012). *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(17), 7583-7592.

- El 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(5), 1080-1088.
- 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(2-3), 203-210.
- Eppleston J., Salamon S., Moore N.H., 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(3-4), 211-225.
- Facchinetti F, Piccinini F, Volpe A. (2000). Chemical ripening of the cervix with intracervical application of sodium nitroprusside: a randomized controlled trial. *Human Reproduction*, 15(10), 2224-2227.
- 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(2), 376–384.
- Fuchs AR, Graddy LG, Kowalski AA, Fields MJ. (2002). Oxytocin induces PGE<sub>2</sub> release from bovine cervical mucosa in vivo. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 70(1-2), 119-129.
- Garfield RE, Saade G, Buhimshi C, Buhimshi I, Shi L, Shi S-Q, Chwalisz, K. (1998). Control and assessment of the uterus and cervix during pregnancy and labour. *Human Reproduction Update*, 4(5), 673-695.
- Goodman RL (1994). Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. *The Physiology of Reproduction*. (2<sup>o</sup> ed., pp 659-709). Raven Press Ltd, New York.
- Gorodeski GI (1996). The cervical cycle. En: Gorodeski GI. *Reproductive Endocrinology. Surgery and Technology*. Philadelphia, pp.301-324.
- Gurtovenko A., Anwar J. (2007). Modulating the Structure and Properties of Cell Membranes: The Molecular Mechanism of Action of Dimethyl Sulfoxide. *The Journal of Physical Chemistry B*, 111(35), 10453-10460.
- Halbert GW, Dobson H, Walton JS, Buckrell BC. (1990). The structure of the cervical canal of the ewe. *Theriogenology*, 33(5), 977-992.
- Hernández P, Rojas R, Gilman RH, Sauvain M, Lima LM, Barreiro EJ, González M, Cerecetto H. (2013). Hybrid furoxanyl N-acylhydrazones as hits for the development of neglected diseases drug candidates. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 59, 64-74.

- Heydon RA., Adams NR. (1979). Comparative morphology and mucus histochemistry of the ruminant cervix: differences between crypt and surface epithelium. *Biology of Reproduction*, 21(3), 557-562.
- Hulboy, D.L., Rudolph, L.A., Matrisian, L.M. (1997). Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Molecular Human Reproduction*, 3(1), 27-45.
- Ing. Agr. Gonzalo Freiría, Ing. Agr. MSc. Daiana Martín. (2020). Anuario estadístico agropecuario. Recuperado de <https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2020/ANUARIO2020.pdf>
- Kershaw CM, Khalid M, McGowan MR, Ingram K, Leethongdee S, Wax G, Scaramuzzi RJ. (2005). The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology*, 64(5), 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(1), 124- 129.
- King ME, McKelvey WA, Dingwall WS, Matthews KP, Gebbie FE, Mylne MJ, Stewart E, Robinson JJ. (2004). Lambing rates and litter sizes following intrauterine or cervical insemination of frozen/thawed semen with or without oxytocin administration. *Theriogenology*, 62(7), 1236-1244.
- Leethongdee S, Kershaw-Young CM, Scaramuzzi RJ, Khalid M. (2010). Intra-cervical application of Misoprostol at estrus alters the content of cervical hyaluronan and the mRNA expression of follicle stimulating hormone receptor (FSHR), luteinizing hormone receptor (LHR) and cyclooxygenase-2 in the ewe. *Theriogenology*, 73(9), 1257-1266.
- Leethongdee S, Khalid M, Bhatti A, Ponglowhapan S, Kershaw CM, Scaramuzzi RJ. (2007). The effects of the prostaglandin E analogue Misoprostol and follicle-stimulating hormone on cervical penetrability in ewes during the peri-ovulatory period. *Theriogenology*, 67(4), 767-777.
- Ledingham M-A, Thomson AJ, Lunan CB, Greer IA, Norman JE. (2001). A comparison of isosorbide mononitrate, misoprostol and combination therapy for first trimester pre-operative cervical ripening: a randomised controlled trial. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 108(3), 276-280.
- Matthews EL, Ayad VJ. (1994). Characterization and localization of a putative oxytocin receptor in the cervix of the Oestrus ewe. *Journal of Endocrinology*, 142(3), 97-405.
- Medana C., Ermondi G., Fruttero R., Di Stilo A., Ferretti C., Gasco A., (1994). Furoxans as Nitric Oxide Donors. 4-Phenyl-3-furoxancarboxitrile: Thiol-

Mediated Nitric Oxide Release and Biological Evaluation. *Journal of Medicinal Chemistry*, 37(25), 4412-4416.

- Moré J. (1984). Anatomy and histology of the cervix uteri of the ewe: new insights. *Acta Anat (Basel)*, 120(3), 156-159.
- Naqvi S, Pandey G, Gautam K, Joshi A, Geethalakshmi V, Mittal J. (2005). Evaluation of gross anatomical features of cervix of tropical sheep using cervical silicone moulds. *Animal Reproduction Science*, 85(3–4), 337-344.
- Notman R., Noro M., O'Malley B., Anwar J.(2006). Molecular Basis for Dimethylsulfoxide (DMSO) Action on Lipid Membranes. *Journal of the American Chemical Society*, 128(43), 13982-13983.
- Phusaanantakul P, Promsonthi P, Chanrachakul B. (2010). Effect of isosorbide mononitrate for cervical ripening before surgical termination of pregnancy in the first trimester. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 110(2), 145-148.
- Robinson JJ, McKelvey WA, King ME, Mitchell SE, Mylne MJ, McEvoy TG, Dingwall WS, Williams LM. (2011). Traversing the ovine cervix - a challenge for cryopreserved semen and creative science. *Animal*, 5(11), 1791-1804.
- RodríguezGavancho F, Muscari J, Sacsara R. (2015). Características morfológicas del cuello uterino de la oveja Corriedale. *Spermova*, 5 (1), 71-74.
- Rodríguez-Piñón, M. (2003). Importancia del cervix ovino como barrera para la Inseminación Artificial. *Unguerfeld, R. Reproducción de los Animales Domésticos. Montevideo, MELIBEA Ediciones*, 2, 353-364.
- Rodríguez Piñón, M. (2006). *Receptores de las hormonas esteroideas sexuales en cervix ovino: estudios en corderas pre-púberes y en ovejas adultas durante el ciclo estral natural e inducido* (Tesis de Maestría). Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo.
- Rodríguez-Piñón M, Tasende C, Puime P and Garófalo EG.(2008). Oestrogens and progesterone receptor binding proteins and oestrogens receptor alpha expression (ER $\alpha$  mRNA) along the cervix in cycling ewes. *Reproduction, Fertility and Development*, 20(3), 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(6), 813–824.
- Rodríguez-Piñón M. (2015). *Estudios endócrinos y moleculares en el Cervix ovino durante el Ciclo Estral y el Anestro Estacional*. Tesis de Doctorado. Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo.

- Rodríguez-Piñón M, García-Barcelo G. (2019). *Efectos de la Oxitocina y/o Prostaglandina E2 de larga acción sobre la actividad colagenas en explantes de cérvix ovino*. Congreso Nacional de Biociencias, Montevideo, Uruguay.
- Ross F, Hernández P, Porcal W, López GV, Cerecetto H, González M, Basika T, Carmona C, Fló M, Maggioli G, Bonilla M, Gladyshev VN, Boiani M, Salinas G (2012). Identification of Thioredoxin Glutathione Reductase Inhibitors That Kill Cestode and Trematode Parasites. *PLoS ONE* 7(4), e35033.
- Salamon S, Maxwell W. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1-3), 77-111.
- Sayre BL, Lewis GS. (1996). Cervical dilation with exogenous oxytocin does not affect sperm movement into the oviducts in ewes. *Theriogenology*, 45(8), 1523-1533.
- Sayre BL, Lewis GS. (1997). Fertility and ovum fertilization rate after laparoscopic or transcervical intrauterine artificial insemination of oxytocin-treated ewes. *Theriogenology*, 48(2), 267-275.
- Scaramuzzi RJ, Adams NR, Baird DT, Campbell BK, Downing JA, Findlay JK, Henderson KM, Martin GB, McNatty KP, Mc Neilly AS, Tsoni CG. (1993). A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reproduction, Fertility and Development*, 5(5), 459-478.
- Stjernholm Y, Sahlin L, Akerberg S, Elinder A, Eriksson HA, Malmstrom A, Ekman G. (1996). Cervical ripening in humans: potential roles of estrogen, progesterone, and insulin-like growth factor-I. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 174(3), 1065-1071.
- 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(3), 889-894.
- Winkler M, Rath W (1999). Changes in the cervical extracellular matrix during pregnancy and parturition. *Journal of Perinatal Medicine*, (vol. 27., pp.45-61). Gruyter
- Winkler M, Oberpichler, A, Tschesche H, Ruck, P, Fischer DC, 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(1) 153-158.
- Wulster-Radcliffe MC, Wang S, Lewis GS. (2004). Transcervical artificial insemination in sheep: effects of a new transcervical artificial insemination instrument and traversing the cervix on pregnancy and lambing rates. *Theriogenology*, 62(6), 990-1002