



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**ALTERACIONES EN MUCUS Y AMBIENTE VAGINAL
PROVOCADAS POR EL USO DE ESPONJAS INTRAVAGINALES
PARA SINCRONIZACIÓN DE CELOS EN OVEJAS**

Med. Vet. Jorgelina Manes, M. Sci.

TESIS DE DOCTORADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

**URUGUAY
2015**



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**ALTERACIONES EN MUCUS Y AMBIENTE VAGINAL
PROVOCADAS POR EL USO DE ESPONJAS INTRAVAGINALES
PARA SINCRONIZACIÓN DE CELOS EN OVEJAS**

Med. Vet. Jorgelina Manes, M. Sci.

Dr. Rodolfo Ungerfeld, M.Sci., Ph.D
Director de Tesis

Dr. Ricardo Alberio, Ph.D.
Co - Director de Tesis

2015



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay

Programa de Posgrados

FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS
DE DOCTORADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

**“Alteraciones en el mucus y medio ambiente vaginal
provocadas por el uso de esponjas intravaginales para
sincronización de celos en ovejas”**

Por: Mag. Jorgelina Manes

Director de Tesis: Dr. Rodolfo Ungerfeld

Codirector de Tesis: Dr. Ricardo Alberio

Tribunal

Presidente: Dr. Pablo Zunino

Segundo Miembro: Dr. Víctor Parraguez

Tercer Miembro: Dr. Edgardo Rubianes

Cuarto Miembro: Dr. Gonzalo Suárez

Quinto Miembro: Dr. Marcelo Rodríguez Piñón

Fallo del Tribunal: Aprobada con Mención

31706

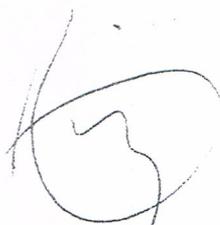
Montevideo, 18 de diciembre de 2015

La Tesis presentada en el día de la fecha por la Dra. Jorgelina Manes titulada "Alteraciones en mucus y ambiente vaginal provocadas por el uso de esponjas intravaginales para sincronización de celos en ovejas" constituye un trabajo de muy buena calidad dirigido a caracterizar la influencia de las esponjas intravaginales sobre el ambiente vaginal y determinar sus posibles efectos sobre la tasa de concepción.

La Tesis refleja un muy importante volumen de trabajo realizado en base a un amplio y variado abordaje experimental que incluyó desarrollos originales. Se constató además un tránsito secuencial a lo largo del estudio desde una fase experimental hasta la aplicación de los conocimientos en una situación productiva de acuerdo a un proceso racional.

La presentación oral fue clara y bien resuelta por medio de una importante capacidad de síntesis. El documento escrito fue correcto, el cual incluyó una importante serie de publicaciones de impacto. Por otra parte, la estudiante respondió con solvencia las preguntas formuladas por este Tribunal.

En base a estas consideraciones el Tribunal otorga la máxima calificación, "Aprobada con Mención".



Dr. Pablo Zunino
Presidente del Tribunal

DEDICATORIA

A Marcos por su amor incondicional, su infinita paciencia y por ser parte de mi vida.

A Victoria y Elena por ser los amores de mi vida y por permitirme robarles parte de su tiempo.

A mis padres, Marta y Jorge, por acompañarme y apoyarme siempre.

AGRADECIMIENTOS

A Rodolfo Ungerfeld por ser mi mentor, por brindarme su confianza y por estar siempre presente a pesar de la distancia. Gracias por su perseverancia, paciencia y dedicación, por las palabras de apoyo y por no dejar de enseñarme durante todos estos años.

A Ricardo Alberio por su apoyo, amistad y confianza. Por abrirme las puertas a la investigación.

A Glenda Ríos y Andrea Fiorentino, compañeras de trabajo, amigas, personas con las que siempre se puede contar y tienen algo bueno para dar.

A mis compañeros del grupo de biotecnología de la reproducción de INTA, que todos en mayor o menor medida han colaborado con este trabajo. Gracias a Federico Hozbor por fomentar la realización de mi doctorado y por apoyarme con los trabajos. Gracias a Pablo Burges y Sergio Dinino por su gran ayuda con el manejo de los animales. A Natividad Ferreira, Jor Buschiazzo, Gemán Kaiser, Jesica Canizo, Rafael Ramírez Vázquez y Alba Ledesma por sus aportes y colaboración.

A Carlos Campero y Silvina San Martino por el apoyo, colaboración y confianza. Su aporte ha sido muy importante en esta tesis.

A Tania Lischinsky, Alejandra Mendez y Jorgelina Lomónaco, auxiliares de los laboratorios de patología y enfermedades venéreas y bacteriología de INTA Balcarce.

Al INTA por financiar mi desarrollo académico

A mis amigos de la vida: Karina, Ana, Analía, María Laura, Lucho y María por ayudarme, entenderme, aguantarme y darme siempre una palabra de aliento.

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

APÉNDICE

Publicaciones I-V

Este trabajo de tesis está basado en las siguientes publicaciones, las que se encuentran referenciadas en el texto mediante números romanos.

- I. Manes, J., Fiorentino, M.A., Kaiser, G., Hozbor, F., Alberio, R., Sanchez, E., Paolicchi, F. 2010. Changes in the vaginal flora after treatment with different intravaginal devices in ewes. *Small Ruminant Research* 94, 201-204.
- II. Manes, J., Fiorentino, M.A., SanMartino, S., Ungerfeld, R. 2015. Stage of the oestrous cycle of ewes in which intravaginal sponges are inserted affects the vaginal microbiota present at sponge withdrawal. Manuscrito en preparación.
- III. Manes, J., Campero, C., Hozbor, F., Alberio, R., Ungerfeld, R. 2015. Vaginal histological changes after using intravaginal sponge for oestrus synchronization in anoestrus ewes. *Reproduction in Domestic Animal* 50, 270-274.
- IV. Manes, J., Ríos, G., Fiorentino, M.A., Ungerfeld, R. 2015. Vaginal mucus from ewes treated with progestogen sponges affect quality of ram spermatozoa. *Theriogenology*, aceptado para su publicación.
- V. Manes, J., Hozbor, F., Alberio, R., Ungerfeld, R. 2014. Intravaginal placebo sponges affect negatively the conception rate in sheep. *Small Ruminant Research* 120, 108-111.

Índice

Abreviaturas	1
Resumen	2
Abstract	4
1. Introducción y antecedentes	5
1.1 Control hormonal de la reproducción	6
1.2 Progesterona y análogos sintéticos (progestágenos)	7
1.3 Tratamientos con esponjas	8
1.4 Dispositivos intravaginales y vaginitis	9
1.5 Dispositivos intravaginales y cambios en la microbiota bacteriana vaginal	9
1.6 Vaginitis y fertilidad	11
1.7 Uso de esponjas y antibioticoterapia	12
2. Caracterización del problema	13
3. Hipótesis	14
4. Objetivos	15
5. Materiales y métodos	16
5.1 Animales, ubicación y manejo general	16
5.2 Procedimientos Experimentales	17
5.2.1 Publicación I	17
5.2.2 Publicación II	17
5.2.3 Publicación III	18
5.2.4 Publicación IV	18
5.2.5 Publicación V	19
5.3 Métodos utilizados	19
5.3.1 Colecta de mucus vaginal	19
5.3.2 Medición de pH y osmolaridad	20
5.3.3 Conteo/recuento bacteriano	20
5.3.4 Identificación de las poblaciones bacterianas	20
5.4 Análisis Estadísticos	20
5.4.1 Publicación I	21
5.4.2 Publicación II	21
5.4.3 Publicación III	21

<i>5.4.4 Publicación IV</i>	21
<i>5.4.5 Publicación V</i>	22
6. Resultados	23
<i>6.1 Publicación I</i>	23
<i>6.2 Publicación II</i>	23
<i>6.3 Publicación III</i>	24
<i>6.4 Publicación IV</i>	24
<i>6.5 Publicación V</i>	25
7. Discusión general	26
8. Conclusiones	29
9. Referencias	30
Anexos	36

Abreviaturas

eCG	Gonadotropina coriónica equina
FGA	Acetato de fluorogestona
FSH	Hormona folículo estimulante
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
h	Horas
IA	Inseminación artificial
LH	Hormona luteinizante
MAP	Acetato de medroxiprogesterona
mL	Mililitros
PBS	Solución buffer fosfatada
PGF2-alfa	Prostaglandina F2 alfa
UFC	Unidades formadoras de colonias

Resumen

Los dispositivos intravaginales impregnados con progesterona o progestágenos son frecuentemente utilizados para la sincronización de los celos en ovejas. Sin embargo, la fertilidad obtenida con estos tratamientos es más baja que la registrada luego de una ovulación espontánea, lo que parece tener un origen multicausal. Con el objetivo de caracterizar las alteraciones en el ambiente vaginal (bacteriológicas, histológicas, citológicas y en el mucus vaginal) generadas por la aplicación de dispositivos intravaginales para la sincronización de celos en ovejas, y determinar si estos cambios explican parte de la disminución en la tasa de concepción del celo sincronizado se realizaron cinco experimentos. De acuerdo a los resultados de los mismos, la presencia de los dispositivos en la vagina (esponjas o dispositivos de silicona) durante 7 o 14 días provoca cambios en el ambiente vaginal caracterizados por un incremento en el número y una alteración en la composición de la microbiota bacteriana vaginal normal. Además, se demostró que la microbiota presente en la vagina varía de acuerdo al momento del ciclo estral, de forma que también, el momento en que se insertan las esponjas modifica las alteraciones observadas al momento de retirar los dispositivos. El incremento bacteriano se debe fundamentalmente al crecimiento de bacterias Gram negativas, principalmente *Haemophilus somni*, *Trueperella pyogenes* y *Escherichia Coli*. La aplicación de esponjas generó hiperplasia e hipertrofia en las células epiteliales de la pared vaginal con presencia de hemorragias e infiltrados perivasculares. Se observó un incremento en el número de células epiteliales, neutrófilos, macrófagos y eritrocitos al momento del retiro de las esponjas. En el cuarto experimento se demostró que el mucus vaginal proveniente de ovejas en celo pretratadas con esponjas impregnadas con medroxiprogesterona afectó negativamente la funcionalidad y viabilidad de los espermatozoides de carnero. El contacto de los espermatozoides con este mucus afectó la motilidad espermática progresiva, la funcionalidad e integridad de la membrana plasmática y el acrosoma, pero también incrementó el número de espermatozoides en apoptosis, disminuyendo entonces el número y la calidad de espermatozoides que pueden atravesar el cérvix. Finalmente, en el quinto experimento se determinó que los cambios provocados por la aplicación de las esponjas son responsables por sí mismos de una significativa reducción en la tasa de concepción. En síntesis, la aplicación de dispositivos intravaginales para sincronización de celos en ovejas produce vaginitis en las que se altera la pared vaginal, las secreciones y el ambiente

vaginal. Esto incluye un importante incremento en la microbiota vaginal, además de cambios en su composición. Todo esto redundando en cambios en el mucus vaginal que alteran la calidad espermática, lo que disminuye la tasa de concepción obtenida con estos tratamientos. Por lo tanto, a partir de estos experimentos se confirma que los resultados de los protocolos para sincronización de celos que incluyen dispositivos intravaginales son afectados no solo por la respuesta ovárica, sino también por los cambios del ambiente vaginal. Las vaginitis generadas por el uso de estos dispositivos son una explicación central en la menor tasa de concepción obtenida con estos tratamientos.

Abstract

Intravaginal devices impregnated with progesterone or progestagens are widely used for oestrous synchronization in ewes. However, the fertility obtained with these treatments is lower than that obtained after a spontaneous ovulation, a problem of multicausal origin. In order to characterize changes in the vaginal environment (bacteriological, histological, cytological and vaginal mucus) generated by the use of intravaginal devices in ewes, and determine whether those changes affect the fertility of the synchronized oestrus five experiments were conducted. According to the results, the presence of the devices in vagina (sponge or silicone devices) for 7 or 14 days provoke changes in the vaginal environment characterized by an increase in the number and alteration in the vaginal bacteria composition. Vaginal microbiota change according to the time of oestrous cycle when the sponges are inserted, and thus, the alterations observed when devices are withdrawn also differ according to the stage of the oestrous cycle in which the sponges were inserted. Bacterial increase is due to the growth of Gram-negative bacteria, mainly *Haemophilus somni*, *Trueperella pyogenes* y *Escherichia Coli*. The use of sponge generated hyperplasia and hypertrophy in the epithelial cells of the vaginal wall with presence of haemorrhage and perivascular infiltrates. An increased number of epithelial cells, neutrophil, macrophages and erythrocytes, was observed. In the fourth study, it was demonstrated that the mucus present in ewes' vagina after a treatment with sponges impregnated with progestagens has negative effects on quality and functionality of ram sperm. Close contact with this mucus affected sperm progressive motility, sperm plasma membrane and affected the acrosome, but also increased the number of apoptotic sperm, thus, overall decreasing the number and the quality of the sperm that may cross through the cervix. Finally, in a fifth study it was demonstrated that the changes caused by the use of the sponge are responsible for a significant reduce in conception rate. In summary, the use of intravaginal devices for oestrus synchronization in ewes induces an increase of the vaginal microbiota, changes in its composition and histological and cytological alterations of the vaginal wall. All this, together with the changes in vaginal mucus that alter sperm quality, reduce the conception rates obtained with these treatments. Therefore, from these experiments we can confirm that the reproductive results of treatments with intravaginal devices are affected by the changes alteration of the normal vaginal environment. The vaginitis generated by using these devices are a main explanation of the lower conception rates obtained with these treatments.

1. Introducción y antecedentes

Las explotaciones de pequeños rumiantes tienen alta relevancia como producción familiar, siendo una excelente opción productiva y económica para pequeños y medianos productores. Sólo en Uruguay, el rubro ovino genera empleos en forma directa o indirecta para más de 50 mil personas (García Pintos, 2009). En Uruguay hay cerca de 9 millones de ovinos, y en Argentina más de 15 millones (Iglesias, 2013). En este último país, el 85% de los productores tienen menos de 100 animales en sistemas de producción mixtos o de pequeña agricultura familiar.

La crisis lanera ocurrida a principios de la década del 90 determinó importantes cambios, especialmente en aquellos países cuya producción se asociaba a una monocultura lanera, como fueron los casos de Argentina y Uruguay. Por ello surgieron alternativas de diversificación de la producción ovina hacia la producción de carne. Los sistemas de producción de carne dependen en gran medida de los resultados reproductivos y del crecimiento del animal. La baja eficiencia reproductiva es una de las mayores limitantes para reactivar y expandir la producción (Cardellino, 2002).

Existe una serie de técnicas y tecnologías asociadas al manejo reproductivo que ayudan a mejorar la producción ovina. La regulación del ciclo estral y la inseminación artificial (IA) son las técnicas que más impacto han tenido en la producción ovina, siendo ambos métodos claves en la difusión del progreso genético. El control de la reproducción permite reducir los períodos improductivos, disminuyendo las etapas de anestro o adelantando la pubertad de las corderas, aumentando así la productividad total de las hembras a lo largo de su vida. Asimismo, permite elegir los períodos reproductivos en función de la disponibilidad de forraje y de las demandas del mercado, logrando incrementar la producción de carne cuando los precios son superiores. Además, limita los partos a períodos más cortos, lo que reduce las pérdidas neonatales al posibilitar mejorar la vigilancia de los mismos.

La IA es la biotecnología de la reproducción que mayor masificación ha alcanzado. Su aplicación permite aumentar el potencial reproductivo de machos genéticamente superiores, disminuye el riesgo de transmisión de enfermedades venéreas, permite reducir el número de machos en los establecimientos e incluso utilizar machos con incapacidad física adquirida. Además, si se acompaña de un adecuado registro e identificación, la IA permite eliminar individuos subfértiles o con características indeseables transmisibles a la descendencia (Gil, 2006).

1.1 Control hormonal de la reproducción

La función reproductiva puede ser controlada por muchos métodos. Algunos de estos, involucran la administración exógena de hormonas que modifican o imitan la cadena de eventos fisiológicos involucrados en el ciclo sexual (Abecia y col., 2012). Otros incluyen sólo métodos naturales como el control de la luz o la exposición a los machos sin la adición de hormonas. Las técnicas farmacológicas permiten agrupar los celos de tal manera que es posible inseminar un gran número de animales en un solo día de trabajo, e incluso sin necesidad de detectar celos. Estos tratamientos pueden ser utilizados tanto durante la estación reproductiva como durante el anestro estacional.

En los ovinos, las técnicas de sincronización de celos más utilizadas incluyen el uso de dispositivos intravaginales impregnados con progesterona o sus análogos sintéticos (progestágenos). Robinson (1956) fue el primero en desarrollar esponjas intravaginales impregnadas con progestágenos para sincronizar el celo y la ovulación en ovejas cíclicas. Actualmente estos dispositivos se utilizan en todo el mundo para sincronizar el celo y la ovulación en pequeños y grandes rumiantes.

Entre las diferentes variantes de dispositivos liberadores de hormonas se encuentran las esponjas de poliuretano de alta densidad, usualmente impregnadas con progestágenos sintéticos [60 mg/esponja de acetato de medroxiprogesterona (MAP), 20-40 mg/esponja de acetato de fluorogestona (FGA)]. Son los dispositivos de elección más utilizados en majadas comerciales, debido principalmente a la practicidad de uso y bajo costo. También existen dispositivos intravaginales comerciales realizados con silicona, impregnados con progesterona, que varían en sus formas, tamaños, y número de veces que pueden ser reutilizados (e.g.: CIDR, Cronipres, DICO). La reutilización de los dispositivos permite reducir costos, pero tiene como desventaja la mayor contaminación de la vagina con dispositivos que no siempre son lavados cuidadosamente, además de generar solamente concentraciones subluteales de progesterona. Los niveles subluteales de progesterona promueven el crecimiento excesivo y la persistencia en el tiempo del folículo dominante (Viñoles y col., 1999) y por tanto la ovulación de un ovocito envejecido, además de alterar el transporte espermático reduciendo el número de espermatozoides que llegan intactos al útero (Hawk y Conley, 1972).

1.2 Progesterona y análogos sintéticos (progestágenos)

Los métodos que utilizan progesterona o sus análogos sintéticos, simulan la acción de la progesterona natural sintetizada por el cuerpo lúteo luego de la ovulación. Los dispositivos intravaginales que liberan progesterona o progestágenos bloquean la ovulación y la manifestación del celo ejerciendo una retroalimentación negativa sobre el eje hipotálamo-hipofisario que inhibe la liberación de gonadotrofinas. En consecuencia, el control de la duración del cuerpo lúteo o la manipulación de las concentraciones circulantes de progesterona permiten determinar el momento en que se va a producir el celo y la ovulación (Hansel y Convey, 1983).

En animales con actividad sexual cíclica (en estación reproductiva) la aplicación de estos dispositivos tiene por finalidad mantener concentraciones de progesterona circulantes similares a las de una fase luteal provocando un efecto inhibitorio sobre el eje hipotálamo-hipofisario. Al retirar los dispositivos desaparece su efecto inhibidor, y se desencadena una fase folicular sincronizadamente, resultando en celo y ovulación (Rubianes y col., 1999). Por otro lado, en aquellos animales que están en anestro estacional (estación no reproductiva), el tratamiento imita una primera fase luteal, necesaria para el reinicio de la actividad sexual normal, la que debe ser seguida de un incremento de gonadotrofinas para inducir la ovulación.

La molécula de la progesterona sintética es igual a la que produce el animal en forma endógena, teniendo una vida media en sangre de pocos minutos ya que se metaboliza rápidamente en el hígado (Orizaba-Chávez y col., 2013). La absorción y biodisponibilidad es diferente dependiendo de la vía de administración. La biodisponibilidad de la progesterona por la vía oral en humanos no supera el 25%, mejorando notablemente cuando se administra en forma micronizada o por vía vaginal (Orizaba-Chávez y col., 2013). El MAP es un progestágeno sintético con una actividad varias veces más potente que la progesterona (10 a 20 veces) (Shelton, 1965), por lo que se utilizan cantidades mucho más reducidas.

La inserción en la vagina de los dispositivos impregnados con progesterona provoca un incremento agudo en la concentración sérica de progesterona que se mantiene elevada durante los primeros 3-4 días. A partir de los 6 días de tratamiento, las concentraciones disminuyen alcanzando concentraciones subluteales (< 1 ng/mL), permaneciendo en concentraciones bajas hasta que los dispositivos son retirados (Rubianes y col., 1998). En ovejas con esponjas intravaginales impregnadas con MAP (Greyling y col., 1994) o FGA

(Gaston-Parry y col., 1988) se observaron farmacocinéticas similares. La vía intravaginal de administración de la progesterona o sus análogos permite la remoción abrupta de estas hormonas.

1.3 Tratamientos con esponjas

En ovejas, los tratamientos tradicionalmente utilizados con progesterona o progestágenos tienen una duración de 12 a 14 días, tiempo suficiente para generar una “fase luteal exógena” de duración similar a una natural (12-14 días en ovejas). En ovejas cíclicas, se administra gonadotrofina corionica equina (eCG, anteriormente llamada PMSG) al retirar las esponjas para lograr una mayor sincronización de la ovulación y de esta forma implementar programas de IA a tiempo fijo (IATF). Esta es una hormona glucoproteica obtenida del suero de yeguas preñadas con actividad folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH). En el caso de animales en anestro, para obtener un alto porcentaje de animales que respondan, el tratamiento deberá asociarse a la administración de eCG al retiro del dispositivo (Ungerfeld y Rubianes, 2002) o al uso del efecto macho (Ungerfeld y col., 2004).

Durante los últimos años se han desarrollado tratamientos cortos, de alrededor de 6 días, que son tan efectivos en inducir y sincronizar los celos como los tratamientos largos, logrando tasas de preñez similares, pero simplificando la aplicación (Rubianes y col., 2001, Ungerfeld y Rubianes, 2002). En ovejas cíclicas, los tratamientos cortos requieren de una dosis de PGF2-alfa para asegurar la luteólisis y de la administración de eCG al momento de retirar el dispositivo para sincronizar la ovulación y/o aumentar la tasa ovulatoria (Menchaca y Rubianes, 2004).

Sin embargo, la tasa de preñez obtenida en ovejas inseminadas luego de la sincronización de celos con progesterona o progestágenos es menor que la obtenida luego de la ovulación espontánea (Robinson, 1968; Hawk y col., 1981), situación que parece tener un origen multicausal. Se ha reportado que se producen fallas en la fertilización (Robinson, 1968), las que pueden ser explicadas por la ovulación de un folículo envejecido (Johnson y col., 1996), la pérdida de espermatozoides a lo largo del tracto reproductivo (Hawk y col., 1971), o la muerte de los espermatozoides en el cervix, útero y oviducto. Asimismo, la aplicación de dispositivos intravaginales predispone al desarrollo de vaginitis causadas por microorganismos oportunistas (Sargison y col., 2007).

1.4 Dispositivos intravaginales y vaginitis

La presencia de estos dispositivos en la vagina durante el tratamiento de sincronización e inducción del celo y ovulación provoca cambios en el ambiente vaginal atribuidos no sólo a su acción física sino también a la constante absorción y retención de secreciones vaginales, sobre todo en el caso de los poliuretanos (Suárez y col., 2006). Por ello, es muy frecuente que se produzca una descarga vaginal hemorrágica, de tipo pútrido que va acompañada, en la mayoría de los casos, de un incremento del número y un cambio en los géneros bacterianos presentes en la vagina al momento de retirar dichos dispositivos tanto en ovejas (Scudamore, 1988; Suárez y col., 2006) como en cabras (Manes y col., 2013). Suárez y col. (2006) reportaron que la presencia de esponjas intravaginales genera una reacción inflamatoria con un aumento de la secreción local de mucus y, de la microbiota bacteriana vaginal independientemente de que las mismas permanezcan *in situ* durante 5, 9 o 13 días. Asimismo, Suárez y col. (2006) observaron la presencia de un importante número de macrófagos en el flujo vaginal luego del retiro de las esponjas.

La vaginitis es una de las enfermedades que más comúnmente afecta el tracto genital, y puede ser provocada por microorganismos que actúan como invasores secundarios oportunistas (Sargison, 2007). En tal sentido, Padula y Macmillan (2006) indicaron que el uso de los dispositivos intravaginales en los bovinos predispone a infecciones vaginales (vaginitis) típicamente caracterizadas por eritema, descarga vaginal purulenta, y la presencia de abundantes leucocitos vaginales (Donders y col., 2002). Blanch (1994) reportó que vacas y vaquillonas suelen desarrollar vaginitis de tipo catarral o catarral purulenta después del servicio a pesar del epitelio escamoso estratificado que reviste la pared vaginal, de la acidez del medio y de la presencia de alta concentración de anticuerpos a nivel local. Asimismo, indicó que la vaginitis por sí sola puede producir una reducción en la fertilidad, al alterar el medio ambiente vaginal, teniendo en cuenta que la vagina es el sitio donde el macho deposita el semen.

1.5 Dispositivos intravaginales y cambios en la microbiota bacteriana vaginal

La microbiota vaginal normal de los animales se compone de bacterias y hongos, incluyendo agentes potencialmente patógenos y agentes oportunistas que permanecen en el animal sin producir enfermedad. Bartlett y col. (1977) sugirieron que los cambios en la microbiota vaginal normal de la vagina humana están correlacionados con el pH, la composición celular, los cambios hormonales y las condiciones bioquímicas. En ratas, ratones, conejos, hámsters y perros se producen cambios cíclicos en el conteo de bacterias en la vagina (Allen y Dagnall, 1982; Baba y col., 1983; Noguchi y col., 2003; Laurusevicius y col., 2008). En estas especies, el número total y la prevalencia de bacterias vaginales fue significativamente mayor durante el celo que durante el diestro o el anestro (Noguchi y col., 2003). En este sentido, Narushima y col. (1997) indicaron que el número total de bacterias se incrementa durante la fase folicular del ciclo menstrual en monos. Noguchi y col. (2003) asumieron que la proliferación de la microbiota vaginal durante el celo fue causada por un aumento de la secreción de moco proveniente del útero, ya que los mucopolisacáridos pueden servir como medio de cultivo (Savage, 1972).

El antagonismo microbiano implica la competencia entre especies de microbios. Como consecuencia de ello, la microbiota normal protege al huésped contra la colonización por los microorganismos potencialmente patógenos, ya sea por la competencia por los nutrientes, o produciendo sustancias nocivas que afecten el desarrollo de los microbios invasores, condiciones que afectan el pH y la disponibilidad de oxígeno (Madigan, 2009). Con la presencia de factores predisponentes, algunas bacterias que normalmente son inofensivas pueden ser patógenos potenciales, multiplicarse y causar enfermedad bacteriana (Holt y col., 1994). Vigue y col. (1959) concluyeron que la vagina sirve como hábitat para muchos tipos de organismos saprófitos, algunos de los que son conocidos como oportunistas, ya que bajo condiciones favorables pueden perjudicar la fertilidad.

La mayor parte de los microorganismos que conforman la microbiota vaginal normal de las mujeres pertenecen al género *Lactobacillus*. En este sistema, los *Lactobacillus* se consideran importantes para la homeostasis vaginal a través de la producción de lactato, el que mantiene un pH vaginal bajo (menor a 4,5) que inhibe la multiplicación de muchos patógenos vaginales (Ravel y col., 2011). Sin embargo, en los pocos estudios que caracterizaron la microbiota vaginal normal en ovejas (Sawyer, 1977; Swartz y col., 2014) y cabras (Manes y col., 2013), la presencia de *Lactobacillus* fue muy escasa.

La microbiota vaginal encontrada normalmente en la vagina de ovejas y cabras es en su mayoría Gram positiva, predominando *Bacillus spp.*, *Corynebacterium spp.* y *Staphylococcus spp.* (Sawyer, 1977; Manes y col., 2013). La aplicación de las esponjas genera un significativo crecimiento en la cantidad de bacterias observado entre el momento de aplicación y el retiro de los dispositivos. Este incremento es debido principalmente al aumento de bacterias coliformes Gram negativas siendo *E. coli* y *Klebsiella spp.* las aisladas con mayor frecuencia (Martins y col., 2009; 2010). Este cambio en la microbiota vaginal se observa al menos a los 5 días de colocados los dispositivos (Suárez y col., 2006); no obstante, el día del celo, el número de colonias retorna a valores similares a los normales tanto en cabras (Manes y col., 2013) como en ovejas (Suárez y col., 2006). Estas alteraciones, podrían ser atribuidas a cambios en el medio ambiente vaginal generados por la presencia de los dispositivos lo que favorecería el desarrollo de enterobacterias oportunistas (Suárez y col., 2006; Sargison y col., 2007). Otra hipótesis para la prevalencia de bacterias oportunistas es que el filamento del dispositivo, que permanece expuesto en la zona perineal y fuera de la vagina podría facilitar el ingreso de microorganismos hacia el tracto reproductivo de la hembra (Oliveira y col., 2013).

Por otro lado, la progesterona y los progestágenos tienen un importante efecto inmunosupresor (Pineda, 2003; Lewis, 2003), lo que por ejemplo podría ser parcialmente responsable del incremento bacteriano en el útero de vacas durante el posparto temprano (Sheldon y col., 2006). Sin embargo, Gatti y col. (2011) encontraron que no hay diferencias en el número total de bacterias aeróbicas observado en la vagina de las ovejas cuando se retiran las esponjas tengan o no tengan MAP.

1.6 Vaginitis y fertilidad

La presencia de flujo vaginal de aspecto, olor y cantidad anormal ha sido relacionada con una alta incidencia de ovocitos no fertilizados y deterioro del desarrollo embrionario en ovejas superovuladas e inseminadas, lo que implicaría bajos porcentajes de preñez de los embriones transferidos (Scudamore, 1988). Asimismo, la presencia del factor infeccioso (alto número de microorganismos Gram negativos) y la presencia de un cuerpo extraño, como es el dispositivo podrían dar lugar a la infiltración con leucocitos al sitio de la inflamación. En este sentido, Suárez y col. (2006) observaron un importante número de macrófagos en el flujo vaginal luego del retiro de las esponjas. La liberación de sustancias

biológicamente activas, tales como radicales libres, en el curso de la inflamación ejerce un efecto tóxico sobre los espermatozoides (Fraczek y Kurpysz, 2007), ya que ocasionan la peroxidación de los lípidos de la membrana espermática, alterando su integridad y funcionalidad (Salomon y Maxwell, 2000). En mujeres con alteraciones en la microbiota vaginal, producto de un incremento en las bacterias Gram negativas, se ha observado una disminución en la probabilidad de fertilidad positiva debido a la acción directa de los componentes bacterianos sobre la viabilidad y movilidad espermática (Gorga y col., 2001). También en mujeres, Deb y col. (2004a, 2004b) han demostrado que algunos lipopolisacáridos de las bacterias Gram negativas provocan una disminución en el porcentaje de preñez a causa de fallas en la implantación y desarrollo de los embriones.

1.7 Uso de esponjas y antibioticoterapia

Para prevenir la vaginitis en los tratamientos de sincronización de celos, algunos laboratorios comerciales recomiendan la inclusión de antibióticos de amplio espectro en la esponja. Suárez y col. (2006) realizaron antibiogramas a las bacterias aisladas al retiro de las esponjas en ovejas y sugirieron que la oxitetraciclina sería la más efectiva en controlar o disminuir las vaginitis generadas por las esponjas. Sin embargo, en trabajos realizados por otros autores, la oxitetraciclina y la penicilina G tuvieron la mayor proporción de colonias resistentes en muestras colectadas de cabras (Manes y col., 2013; Oliveira y col., 2013). Gatti y col. (2011) observaron que el agregado de oxitetraciclina por vía local (impregnando la esponja antes de insertarla) controló mejor el crecimiento bacteriano que el tratamiento con el antibiótico sistémico (vía parenteral). Por su parte, Martins y col. (2009) incluyeron a la ciprofloxacina y a trimetroprim sulfametazole como antibióticos efectivos en el control de la vaginitis provocada por el uso de esponjas intravaginales. Si bien la tasa de concepción obtenida tras el uso de esponjas con o sin antibiótico es similar (Viñoles et al., 2011), hay que ser muy cautelosos al interpretar estos resultados, ya que esto no implica que la microbiota presente tras el uso de esponjas con antibióticos no esté también alterada, y por tanto afecte de forma similar el resultado que cuando se usan esponjas con o sin antibióticos.

2. Caracterización del problema

La sincronización de celos es una herramienta ampliamente utilizada en programas de mejoramiento genético de los sistemas de producción animal. En los ovinos, las técnicas de sincronización de celos más utilizadas incluyen el uso de dispositivos intravaginales impregnados con progesterona o sus análogos sintéticos (progestágenos). Sin embargo, la fertilidad posterior a estos tratamientos es inferior a la obtenida en celos naturales (espontáneos).

La presencia de estos dispositivos en la vagina durante el tratamiento de sincronización e inducción del celo y ovulación provoca cambios en el ambiente vaginal atribuidos no sólo a su acción física sino también a la constante absorción y retención de secreciones vaginales, sobre todo en el caso de los poliuretanos. La aplicación de estos dispositivos es un factor predisponente para las vaginitis y esto podría ser uno de los factores que afectan la fertilidad.

No está claro que otros cambios pueden ser generados por el uso de dispositivos para sincronización de celos en la vagina, ni cuanto inciden las vaginitis en la viabilidad y motilidad espermáticas, y finalmente sobre la menor fertilidad observada en los celos sincronizados comparados con los celos espontáneos.

Los antecedentes detallados indican que al evaluar los resultados de los protocolos para sincronización de celos que incluyen dispositivos intravaginales, es importante tener en cuenta no sólo la respuesta ovárica y hormonal de la hembra estimulada sino también los cambios generados con los mismos en la vagina. Esto último, es muy importante en especies como la oveja y la cabra donde con las técnicas de rutina el semen sólo puede ser depositado en el fondo de la vagina o rara vez atravesar un anillo del cuello del útero.

La realización de este trabajo plantea evaluar los cambios provocados en la vagina por el uso de dispositivos para inducción y sincronización de celos en ovejas. Además, pretende no sólo generar información novedosa en un tema en el que, tanto a nivel nacional como internacional, existen muy pocos antecedentes, sino también proveerá alternativas para mejorar los procesos de sincronización de celos y herramientas para optimizar los resultados de los programas de IA.

3. Hipótesis

3.1 Hipótesis General

La aplicación de esponjas o dispositivos intravaginales para sincronización de celos en ovejas genera cambios en el ambiente vaginal (bacteriológicos, histológicos, citológicos y en el mucus vaginal) que son en parte responsables de la menor tasa de preñez observada luego de su uso.

3.2 Hipótesis específicas

3.2.1 El tipo de dispositivo intravaginal aplicado (esponjas o dispositivos de silicona) y la duración del tratamiento (7 o 14 días) modifica en forma similar la microbiota bacteriana vaginal.

3.2.2 El momento del ciclo estral en que se inserta una esponja intravaginal influye en los cambios generados después del retiro de la misma en la composición de la microbiota bacteriana de la vagina.

3.2.3 La presencia de esponjas intravaginales durante 14 días provoca cambios histológicos y citológicos de la vagina indicadores de inflamación.

3.2.4 El mucus vaginal de ovejas en celo pre-tratadas con esponjas afecta negativamente la viabilidad y la funcionalidad de los espermatozoides.

3.2.5 La menor tasa de concepción observada en tratamientos de sincronización de celos en ovejas es al menos parcialmente adjudicable a la vaginitis generada por el uso de las esponjas.

4. Objetivos

4.1 Objetivo General

Caracterizar las alteraciones vaginales generadas por la aplicación de dispositivos intravaginales para la sincronización de celos en ovejas y evaluar si estos cambios afectan la tasa de concepción del celo sincronizado.

4.2 Objetivos Específicos

4.2.1 Caracterizar los cambios en la microbiota bacteriana vaginal en ovejas tratadas con esponjas o dispositivos intravaginales siliconados durante 7 o 14 días (Publicación I).

4.2.2 Determinar si la carga bacteriana vaginal se modifica a lo largo del ciclo estral y por tanto, si el momento del ciclo estral en que se aplican las esponjas incide en las alteraciones en la microbiota bacteriana vaginal observadas después del retiro (Publicación II).

4.2.3 Describir los cambios citológicos e histológicos que ocurren en la vagina luego de la aplicación de esponjas intravaginales durante 14 días (Publicación III).

4.2.4 Determinar si el mucus proveniente de ovejas en celo pre-tratadas con esponjas intravaginales afecta la funcionalidad y viabilidad espermática (Publicación VI).

4.2.5 Determinar si la vaginitis generada por la presencia de la esponja en la vagina es responsable de una reducción de la tasa de preñez del celo sincronizado (Publicación V).

5. Materiales y métodos

5.1 Animales, ubicación y manejo general

Los experimentos de las Publicaciones I a IV se realizaron en el campo experimental “Reserva 8” de producción ovina perteneciente a la Estación Experimental Agropecuaria del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), en Balcarce, Argentina (37° 45' S; 53° 18' O) con ovejas de raza Texel. El experimento de la Publicación V se realizó en un predio comercial ubicado cerca de Tacuarembó, Uruguay (31° 42' S; 55° 49' O) con ovejas de la raza Merino Australiano.

Los animales utilizados en esta tesis fueron manejados bajo estricto cumplimiento de las prácticas de bienestar animal aplicadas por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal de la Universidad de la República, Uruguay.

Todos los trabajos se realizaron durante la estación reproductiva (marzo-mayo, otoño), con excepción del experimento de la Publicación III que se realizó durante la estación no reproductiva (octubre) para evitar una posible influencia del momento del ciclo estral sobre las características histológicas y citológicas de la pared vaginal. En todos los casos se utilizaron ovejas adultas, múltiparas y con buena condición corporal (≥ 3 en la escala 1 a 5, donde 1= emaciado y 5= obeso). Salvo en el trabajo realizado en Uruguay (Publicación V), donde los animales pastoreaban campo natural, en todos los demás experimentos los animales se encontraban en una pastura de Ray grass perenne (*Lolium perenne*), Festuca (*Festuca arundinacea*) y Trébol blanco (*Trifolium repens*).

La detección de celos se realizó con carneros vasectomizados en los experimentos de las Publicaciones I a IV. Para evitar la contaminación de la microbiota vaginal desde el tracto reproductivo de los machos se les colocó un delantal protector. En el experimento de la Publicación V se utilizaron capones androgenizados. En todos los casos, los animales fueron seleccionados por su buena condición corporal, estado del sistema locomotor y visión.

Con excepción del experimento de la Publicación I, las esponjas utilizadas en todos los experimentos fueron confeccionadas con el mismo lote de poliuretanos (densidad $\frac{1}{4}$ 22 kg/m³ con 2 cm de diámetro y 6 cm de largo). La cantidad de esponjas necesarias para cada trabajo fue impregnada con 60 mg de MAP (acetato de medroxiprogesterona USP23, Farmabase, Rovereto, Italia). Luego de ello, las esponjas fueron embaladas en paquetes de 10 unidades dentro de bolsas de polietileno para reducir al mínimo la contaminación, y

posteriormente, previo a su uso, fueron esterilizadas con óxido de etileno (Biolene, Buenos Aires, Argentina).

5.2 *Procedimientos experimentales*

5.2.1 Publicación I

Se utilizaron 21 ovejas cíclicas, las que fueron adjudicadas a 4 grupos experimentales según el dispositivo intravaginal aplicado y la duración de los tratamientos en un arreglo factorial 2x2. La mitad de los animales recibió una esponja intravaginal impregnadas con MAP que permaneció en la vagina durante 7 (grupo I; n=6) o 14 (grupo II; n=5) días. Previo a la colocación, las esponjas fueron impregnadas con oxitetraciclina en polvo. El resto de las ovejas fue tratado con un dispositivo de silicona inerte con 160 mg de progesterona que al igual que en el caso anterior permaneció en la vagina durante 7 (grupo III; n=5) o 14 (grupo IV; n=5) días. Al retiro de los dispositivos se aplicaron 200 UI de eCG. Los días de colocación y retiro de los dispositivos y el día de IA se tomaron muestras de mucus cervico-vaginal para caracterizar por género la microbiota bacteriana vaginal y evaluar el pH de la vagina.

5.2.2 Publicación II

Se administraron 2 dosis de un análogo de PGF2-alfa separadas por 8 días a 80 ovejas, y se registró el celo diariamente durante 4 días después de la segunda dosis. Las hembras que manifestaron celo fueron asignadas aleatoriamente a cada uno de los tres grupos experimentales. En el día del celo, 15 ovejas recibieron una esponjas intravaginal impregnada con MAP, la que se mantuvo *in situ* durante 12 días (GOe). Otras 15 hembras recibieron el mismo tratamiento 2 días después de la detección del celo (GMet). El tercer grupo de ovejas (n = 15) recibió el tratamiento 8 días después de la detección del celo (GDi). Al momento de la colocación de los dispositivos, al retiro, y a las 24 y 48 h post-retiro se tomaron muestras de mucus cérvico-vaginal para determinar el número total de bacterias aeróbicas e identificar los géneros bacterianos presentes en cada momento.

5.2.3 Publicación III

Treinta y cinco ovejas fueron asignadas aleatoriamente a 3 grupos experimentales según el momento en que se tomaron las muestras del fondo de la vagina para histopatología y citología. De estas ovejas, 11 permanecieron sin esponja. Las restantes 24 ovejas fueron tratadas durante 14 días con una esponja intravaginal impregnada con MAP. Se obtuvieron muestras de 10 de ellas el día del retiro de las esponjas y de las 14 restantes el día del celo o 72 h después del retiro de las esponjas en los casos en los que no se detectó la manifestación de celo. En la evaluación citológica se determinó el número de células epiteliales e inflamatorias (neutrófilos y macrófagos), eritrocitos y células autolíticas. De acuerdo con el número de células observadas en cada campo (celularidad), las muestras fueron clasificadas en 4 categorías, donde 0 correspondió a muestras sin células, 1 cuando había 4 a 5 células, 2 con 6 a 7 células, y 3 los que presentaban 8 o más células.

5.2.4 Publicación IV

Se colectó semen de 10 carneros adultos de raza Texel mediante vagina artificial. En los eyaculados se determinó el volumen, la concentración, y la movilidad masal espermática, y se utilizaron solamente los eyaculados con movilidad masal ≥ 4 (escala 0-5). Para minimizar los efectos individuales, se juntaron los eyaculados de 3 carneros, incluyendo 20×10^8 espermatozoides por carnero.

Este semen se dividió en 4 alícuotas de 100×10^6 espermatozoides que fueron co-incubados a 38° C en 5% de CO₂ con: 1) mucus vaginal colectado de ovejas con celo espontáneo; 2) mucus vaginal colectado de ovejas en celo pre-tratada con esponjas; 3) mucus sintético (adaptado de Anilkumar y col. 2001); y 4) medio M199 más 0,1 mg/mL L-glutamina y 2,2 mg/mL de NaHCO₃ sin mucus como grupo control. Las muestras semen-mucus se incubaron durante 90 minutos y las evaluaciones del semen se realizaron a los 30 y 90 minutos.

Las muestras de mucus vaginal se colectaron de 120 ovejas que fueron pre-sincronizadas con 2 dosis de un análogo de PGF₂-alfa separadas por 8 días. Después de la segunda dosis de PGF₂-alfa, se registró el celo dos veces al día durante 5 días. Las primeras 36 ovejas detectadas en celo fueron asignadas aleatoriamente a dos grupos: 1) 2 días después de la detección del celo se colocó una esponja impregnada con MAP durante 14 días (n=19); 2) permanecieron sin esponjas para proporcionar mucus de ovejas en celo

espontáneo de manera simultánea con las tratadas con esponjas (n=17). Todas las ovejas se colocaron con carneros vasectomizados para la detección de celo a los 16 días del primer celo.

En el mucus se midió el pH y la osmolaridad, se cuantificó el total de unidades formadoras de colonias de bacterias aeróbicas (UFC), y se identificaron los géneros bacterianos. En las muestras semen-mucus incubadas se evaluó la movilidad espermática total y la movilidad rectilínea progresiva. Además, se determinó la integridad y funcionalidad de la membrana plasmática, la integridad acrosomal y el porcentaje de espermatozoides apoptóticos.

5.2.5 Publicación V

Se utilizaron 579 ovejas adultas, a las que se les inyectó un análogo de PGF2-alfa. Se registró diariamente el celo durante 5 días, y las hembras detectadas en celo fueron separadas aleatoriamente en tres grupos experimentales. A las ovejas del grupo MAP (n = 200) se les colocó una esponja impregnada con MAP 2 días después de la detección del celo, la que permaneció *in situ* por 13 días. A las ovejas del segundo grupo (n=156 ovejas) se les colocó una esponja intravaginal sin MAP a los 2 días del celo, la que también permaneció *in situ* durante 13 días. Para determinar la tasa de concepción de los celos espontáneos, las ovejas restantes (n=213) permanecieron sin tratamiento como grupo control. A los 15 días de los primeros celos, todas las ovejas se colocaron con capones androgenizados y, las ovejas detectadas en celo fueron inseminadas a las 12 h por vía cervical con un pool de semen fresco obtenido de 3 carneros adultos (100 millones de espermatozoides/oveja). La preñez se determinó 30 días después del celo mediante ultrasonografía rectal (Aloka SSD 500 con traductor de 5 MHz, Tokyo, Japón).

5.3 Métodos utilizados

5.3.1 Colecta de mucus vaginal

Las muestras de mucus vaginal se colectaron por duplicado de la región posterior de la vagina usando un espéculo, y un hisopo estéril. Luego fueron transportadas inmediatamente al laboratorio en medio Amies. En la Publicación IV, para la toma de

muestras, se utilizó un espéculo y el mucus se aspiró mediante vaina azul y jeringa de inseminación, teniendo cuidado de no frotar la pared vaginal.

5.3.2 Medición de pH y osmolaridad

Para determinar el pH se utilizaron tiras indicadoras (Merck, Berlín, Alemania) y la osmolaridad del mucus vaginal se registró utilizando un osmómetro (Osmomat 3000, Gonotec, Berlín, Alemania).

5.3.3 Conteo/recuento bacteriano

El conteo del total de bacterias aerobias se realizó como describieron Suárez y col. (2006). Los hisopos con el mucus vaginal fueron agitados con vórtex en 1 mL de solución salina estéril tamponada con fosfato (PBS), durante 1 min para suspender las bacterias. Para determinar el número de UFC/mL, se realizaron diluciones seriadas de la suspensión. Las mismas fueron cultivadas por duplicado en placas con agar sangre Columbia (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) con el agregado de 7% de sangre bovina desfibrinada, incubadas a 37°C, bajo 10% de CO₂ y las UFC/mL fueron contadas a las 48 h.

5.3.4 Identificación de las poblaciones bacterianas

Los géneros bacterianos fueron identificados en base a características de las colonias, tinción de Gram, morfología microscópica y reacciones bioquímicas, incluyendo la ureasa, indol, nitrato, motilidad, las pruebas de actividad de la catalasa y la fermentación de hidratos de carbono. Los géneros fueron clasificados según Holt y col. (1994). En la Publicación II, también se utilizaron los test de diagnóstico rápido API (bioMe'rieux, Marcy l'Etoile, Francia) 20E, STAPH y 50CH para la identificación fenotípica de la familia *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* y *Bacillus*, respectivamente. Todas estas pruebas se realizaron según las especificaciones del fabricante.

5.4 Análisis Estadísticos

Todos los análisis estadísticos de esta tesis se realizaron utilizando SAS 9.2 y R 3.1.2. Los datos se consideraron estadísticamente significativas cuando $P \leq 0,05$.

5.4.1 Publicación I

Los efectos de los tratamientos sobre el pH vaginal y sobre el intervalo retiro de las esponjas-celo se evaluaron usando ANOVA.

5.4.2 Publicación II

La cantidad de UFC/mL se comparó mediante ANOVA para medidas repetidas después de la transformación logarítmica. El número de diferentes tipos de colonias con diferente morfología se analizó utilizando ecuaciones de estimación generalizadas (GEE), considerando una distribución Poisson para la respuesta y una función de enlace log. La presencia de bacterias Gram positivas, Gram negativas y ambas, Gram positivas y negativas simultáneamente se analizó considerando un modelo logístico multinomial con enlace log para evaluar los efectos de tratamiento, tiempo y su interacción.

Basado en un modelo logístico, en cada bacteria (*Bacillus spp*, *Haemophilus somni*, *Trueperella pyogenes* y *Staphylococcus spp.*), se utilizó la prueba de verosimilitud para determinar los efectos del momento del ciclo estral en que las esponjas fueron insertadas, el tiempo de evaluación y su interacción. A partir del modelo resultante, se calcularon los cocientes de chances para cada especie bacteriana y se obtuvieron los intervalos de confianza asintóticos de 95%. Sólo fueron evaluadas las bacterias con mayor prevalencia.

5.4.3 Publicación III

Las frecuencias de las muestras con cambios histológicos se compararon mediante el test Exacto de Fisher. Los datos citológicos se compararon con el test de Kruskal-Wallis.

5.4.4 Publicación IV

El pH y la osmolaridad del mucus vaginal de ovejas en celo tratadas o no con esponjas se compararon mediante ANOVA. Las UFC/mL se compararon mediante ANOVA después de la transformación logarítmica.

Todos los parámetros espermáticos evaluados a los 30 o 90 minutos de incubación se compararon entre los 4 tratamientos utilizando el procedimiento GLIMMIX de SAS. El modelo estadístico incluyó los efectos de los tratamientos y de la fecha de muestreo.

5.4.5 Publicación V

La tasa de concepción se comparó con el test de probabilidad exacta de Fisher.

6. Resultados

6.1 Publicación I: Cambios en la flora aeróbica vaginal después de tratamientos con diferentes dispositivos intravaginales en ovejas

Se observaron cambios en la microbiota bacteriana vaginal de las ovejas con los dos dispositivos utilizados, independientemente de la duración de los tratamientos. Antes de la aplicación de los mismos, la microbiota bacteriana vaginal era predominantemente Gram positiva (*Bacillus spp.*, *Stafolococcus spp.* y *Corynebacterium spp.*) y luego de su retiro, en la mayor parte de las muestras evaluadas las bacterias aisladas fueron Gram negativas, principalmente Enterobacterias (*Escherichia coli* fue la más frecuente). Sólo en el 20% de las muestras evaluadas al retiro de los dispositivos prevalecieron las bacterias Gram positivas. En el momento de la IA e independientemente del dispositivo usado, en el 60% de las ovejas tratadas volvió a predominar la microbiota Gram positiva. En las ovejas con tratamientos de 7 días de duración, el 82% de las muestras presentó crecimiento de bacterias Gram negativas. No se observó diferencias entre los tratamientos en los valores de pH en el día 0 y el día de la IA.

6.2 Publicación II: El momento del ciclo estral en que se insertan esponjas intravaginales en ovejas afecta la microbiota bacteriana vaginal presente al retiro de las esponjas

La cantidad de UFC/mL no fue afectada por el momento del ciclo estral en que se insertaron las esponjas, pero se registró un aumento luego del uso de las esponjas, disminuyendo 24 h más tarde sin alcanzar a las 48 h pos-retiro el nivel basal observado previo a la colocación de las mismas. El número de diferentes tipos de colonias al momento de insertar las esponjas fue mayor en las ovejas de GMet mientras que luego del retiro, en todos los muestreos realizados, este mismo tratamiento presentó los menores valores. Se observó un mayor crecimiento de bacterias Gram negativas en GMet que en GDi y GOe 24 y 48 h después del retiro de las esponjas. La chance de aislar *Bacillus spp.* fue más baja en GMet que en ovejas en GDi, mientras que la presencia de *Staphylococcus spp.* fue mayor al momento de insertar las esponjas en las ovejas de GMet. Independientemente del momento del ciclo estral, la chance de aislar *Trueperella pyogenes*

and *Haemophilus somni* fue mayor después del retiro de las esponjas (días 12, 13 y 14) que el día de inserción de las mismas.

6.3 Publicación III: Cambios histológicos vaginales después del uso de esponjas intravaginales para sincronización de celos en ovejas en anestro

La aplicación de esponjas intravaginales generó una respuesta inflamatoria con cambios histológicos y citológicos de la pared vaginal. Antes de la colocación de las esponjas, la vagina presentó un epitelio escamoso estratificado con células planas y con un moderado infiltrado de linfocitos y células plasmáticas en la lámina propia. Luego de 14 días de tratamiento con esponjas se observó hiperplasia e hipertrofia de las células epiteliales de la vagina en el 90% de las muestras evaluadas. Estos cambios permanecieron incluso en el momento del celo o 72 h después del retiro de las esponjas. Asimismo, luego del retiro de las esponjas, se observó un incremento en la vascularización del estroma, en los infiltrados perivasculares y en la presencia de células vacuoladas que no fueron detectadas en las hembras del grupo control.

Se observó un incremento significativo en el número de células epiteliales, neutrófilos, macrófagos y eritrocitos al retiro de las esponjas, que retornó a los valores basales al momento del celo o a las 72 h del retiro de las esponjas en las hembras que no fueron detectadas en celo.

6.4 Publicación IV: El mucus vaginal de ovejas tratadas con esponjas impregnadas con progestágenos afecta la calidad de los espermatozoides de carneros

El mucus vaginal colectado de ovejas tratadas con esponjas presentó mayor pH, osmolaridad, y mayor cantidad de UFC/mL que el mucus de las hembras del grupo no tratado. La incubación con mucus proveniente de ovejas pretratadas con esponjas determinó una disminución en el porcentaje de espermatozoides con motilidad espermática progresiva, con membrana plasmática íntegra y funcional, y un aumento en el porcentaje de espermatozoides con daño acrosomal y en apoptosis.

Por el contrario, no hubo efectos negativos en los parámetros espermáticos evaluados en las muestras incubadas con mucus colectado de ovejas con celo espontáneo o con mucus sintético. Incluso, las muestras incubadas con mucus colectado de ovejas con celo

espontáneo tuvieron más espermatozoides con membrana intacta y menos espermatozoides con daño en el acrosoma que los incubados en estos otros grupos.

6.5 Publicación V: El uso de esponjas intravaginales placebo afecta negativamente el porcentaje de concepción en ovejas

La tasa de concepción de las ovejas tratadas con esponjas intravaginales fue menor que la de las ovejas del grupo control (sin esponjas). Sin embargo, no se observaron diferencias en la tasa de concepción entre las ovejas tratadas con esponjas impregnadas o no con MAP. En ambos tratamientos, el intervalo desde el retiro de las esponjas hasta el celo fue similar.

7. Discusión general

Estos resultados en su conjunto demuestran que la aplicación intravaginal de esponjas o dispositivos de siliconas durante los protocolos de sincronización de celos en ovejas generan una respuesta inflamatoria aguda del ambiente vaginal que impacta negativamente en la tasa de concepción. Las vaginitis incluyen cambios en la composición de la microbiota bacteriana normal, fundamentalmente un importante aumento en la presencia de bacterias coliformes Gram negativas así como también modificaciones histológicas y citológicas de la pared vaginal. La presencia de la esponja como cuerpo extraño en la vagina generaría condiciones favorables para la multiplicación de las enterobacterias oportunistas y el desarrollo de las vaginitis que podrían tener un efecto directo sobre la capacidad fecundante de los espermatozoides. Suárez y col. (2006) propusieron que los cambios en el ambiente vaginal no sólo se deben a la acción física de la esponja en la vagina sino también a la constante absorción y retención de las secreciones vaginales por efecto de los poliuretanos.

En las Publicaciones I y II se observó un patrón de evolución de la microbiota bacteriana vaginal similar, también similar al reportado por Suárez y col. (2006) y Gatti y col. (2011): un aumento significativo al momento de retirar los dispositivos y un marcado descenso al día siguiente del retiro de la esponjas, sin alcanzar los valores basales 48 h después del retiro. Aunque las UFC/mL presentaron un marcado descenso en el momento de la IA, los cambios en la composición de la microbiota bacteriana vaginal persistieron aún después de 72 h del retiro de las esponjas. En el mismo sentido, Oliveira y col. (2013) reportaron que la normalización de la microbiota ocurre al menos una semana después del retiro de las esponjas.

Antes de la colocación de los dispositivos predominaban las bacterias Gram positivas, fundamentalmente las especies del género *Bacillus spp.* y *Staphylococcus spp.*. Por el contrario, al retirar los dispositivos (esponjas o dispositivos de silicona) la microbiota dominante cambió a Gram negativa (Publicaciones I y II). Los lipopolisacáridos de las bacterias Gram negativas han sido relacionados con infertilidad y pérdidas de embarazo en mujeres debido a la acción directa de los componentes bacterianos sobre la viabilidad y movilidad espermática (Gorga y col., 2001). En este sentido, *Escherichia coli* (Publicación I), *Trueperella pyogenes* and *Haemophilus somni* (Publicación II) fueron las bacterias con mayor prevalencia luego del retiro de las esponjas. Todas ellas son consideradas patógenas oportunistas y están relacionadas con severos desórdenes reproductivos.

Los resultados de la Publicación II demuestran que los cambios en la microbiota bacteriana vaginal observados al retiro de las esponjas difieren según el momento del ciclo estral en que se insertan las mismas. En este estudio, las ovejas que recibieron las esponjas dos días después del celo (GMet) fueron las que mostraron las mayores diferencias en los parámetros estudiados. La diferente condición biológica del entorno vaginal generada por los diferentes momentos del ciclo estral modifican no sólo la composición de la microbiota vaginal normal, sino también la respuesta bacteriológica producto de la presencia de la esponja.

La aplicación de esponjas generó hiperplasia e hipertrofia epitelial con presencia de hemorragias e infiltrados perivasculares (Publicación III). Se observó un incremento en el número de células epiteliales, neutrófilos, macrófagos y eritrocitos luego del retiro de las esponjas. Estos resultados coincidieron con los reportados por Suárez y col. (2006) quienes observaron la presencia de un importante número de macrófagos en el flujo vaginal luego del retiro de las esponjas. Estos cambios citológicos revelan la movilización y migración de leucocitos como consecuencia del estímulo quimiotáctico causado directa o indirectamente por la esponja. Los leucocitos presentes en el epitelio vaginal pueden actuar contra los espermatozoides disminuyendo la probabilidad de que se produzca la fecundación del ovocito ovulado en el celo sincronizado. Además, durante estos procesos inflamatorios se liberan sustancias biológicamente activas, tales como radicales libres, que ejercen un efecto tóxico sobre los espermatozoides (Fraczek y Kurpisz, 2007) ya que ocasionan la peroxidación de los lípidos de la membrana espermática, alterando su integridad morfológica y movilidad (Salomon y Maxwell, 2000). La persistencia de estos cambios al momento de realizar una IA podría contribuir en la reducción del porcentaje de concepción obtenido después del uso de esponjas intravaginales.

A su vez, los espermatozoides que atraviesan el mucus cervical de ovejas pretratadas con esponjas presentan alteraciones en su funcionalidad y viabilidad, disminuyendo el número y la calidad de los espermatozoides que pueden cruzar a través del cérvix (Publicación IV). Es interesante que mientras la mayoría de los aspectos de calidad seminal estudiados se vieron afectados negativamente por el contacto con el mucus proveniente de las vaginas de ovejas tratadas con esponjas, no hubo efectos negativos del contacto con el mucus de ovejas con celo espontáneo. Más aún, se observaron más espermatozoides con membrana intacta y menos espermatozoides con daño acrosomal cuando estuvieron en contacto con mucus de celo espontáneo, lo que podría sugerir un efecto protector del mucus presente durante los celos espontáneos sobre los

espermatozoides. Estos resultados podrían explicar por qué la presencia de esponjas intravaginales tiene un efecto negativo en la tasa de concepción en los tratamientos de sincronización de celos en ovejas.

En la Publicación V se observó una reducción en la tasa de concepción en los grupos tratados con esponjas de más del 10%, sin que se observaran diferencias de acuerdo a que las esponjas contuvieran o no MAP. De acuerdo a los resultados de las Publicaciones I a IV, una posible explicación para esta disminución es una reducción en la calidad espermática como consecuencia de un ambiente vaginal alterado. La presencia de la esponja generaría condiciones favorables para el desarrollo de bacterias que no solo pueden alterar la funcionalidad de los espermatozoides sino también atraer células inflamatorias capaces de liberar compuestos que afectan a las bacterias y a los espermatozoides. Asimismo, en el proceso inflamatorio se producen cambios en las paredes vaginales y se alteran las características del moco cervical que los espermatozoides deben atravesar. Es evidente que en este medio vaginal perturbado, la capacidad fecundante de los espermatozoides se ve reducida y con ello, la probabilidad de que se produzca la fecundación. Además, la presencia predominante de bacterias como *Escherichia coli* capaces de provocar diversas alteraciones espermáticas, tales como la reducción de la movilidad, inducir daños estructurales y hasta la muerte celular (Yániz y col, 2010) contribuyen en forma conjunta con las modificaciones del ambiente vaginal a disminuir la cantidad de espermatozoides viables y funcionales. Esto último es muy importante porque la vagina es el sitio donde el macho deposita el semen durante el servicio natural y es el lugar donde se deposita la dosis de semen durante la IA ya que la compleja anatomía del cérvix de la oveja impide el acceso al útero. Teniendo en cuenta todo lo mencionado, se puede afirmar que los resultados de la aplicación de dispositivos intravaginales en protocolos para sincronización de celos en ovejas son afectados no sólo por la respuesta ovárica, sino también por las alteraciones generadas en el ambiente vaginal.

8. Conclusiones

- 8.1 La aplicación de dispositivos intravaginales en ovejas independientemente de su composición (silicona o poliuretanos) y de la duración de los tratamientos (7 o 14 días) alteró la microbiota bacteriana vaginal normal.
- 8.2 La microbiota bacteriana vaginal en ovejas cambia según el momento del ciclo estral en que es evaluado.
- 8.3 El momento del ciclo estral en que se insertaron las esponjas modificó las alteraciones provocadas por el uso de esponjas en la composición de la microbiota bacteriana vaginal normal.
- 8.4 La aplicación de esponjas intravaginales en ovejas en anestro generó cambios histológicos y citológicos de la pared vaginal indicativos de una inflamación subaguda.
- 8.5 El mucus cervical proveniente de ovejas pretratadas con esponjas impregnadas con MAP en tratamientos de sincronización de celos afectó negativamente la funcionalidad y viabilidad de los espermatozoides de carnero.
- 8.6 La vaginitis generada por las esponjas intravaginales es responsable de una significativa reducción en la tasa de concepción de los protocolos de sincronización de celos en ovejas cíclicas.
- 8.7 Los resultados de los protocolos para sincronización de celos en ovejas, que incluyen dispositivos intravaginales, son afectados no sólo por la respuesta ovárica sino también por los cambios generados en el ambiente vaginal.

9. Referencias

- 1) Abecia JA, Forcada F, Gonzáles-Bulnes A. (2012). Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Anim Reprod Sci* 130:173-179.
- 2) Allen WF, Dagnall GJR. (1982). Some observations on the aerobic bacterial flora of the genital tract of the dog and bitch. *J Small Anim Pract* 23: 325-326.
- 3) Anilkumar R, Devanathan TG, Pattabiraman SR, Edwin MJ. (2001). Correlation between the spermatozoal characteristics and sperm penetration distance in polyacrylamide gel and bovine cervical mucus. *Theriogenology* 55: 685-691.
- 4) Baba E, Hata H, Fukata T, Arakawa H. (1983). Vaginal and uterine microflora of adults dog. *American J Vet Res* 44, p606.
- 5) Bartlett JG, Onderdonk AB, Drude E, Goldstein C, Anderka M, Alpert S, McCormack WM. (1977). Quantative bacteriology of the vaginal flora. *J Infect Dis* 136: 271-277.
- 6) Blanch S. (1994). La metritis bovina. *R.I.A.* 25: 1-11.
- 7) Cardellino R. (2002). El total de lo exportado por Uruguay de lana y derivados fue de 180 millones de dólares, de setiembre 2001 al 31 de octubre 2002. www.uruguay2030.com/LaOnda/LaOnda/Entrevistas/Ing%20Roberto%20Cardellino.htm Accedido: 24/05/2007.
- 8) Deb K, Chaturvedi MM, Jaiswal YK. (2004a). Comprehending the role of LPS in Gram-negative bacterial vaginosis: ogling into the causes of unfulfilled child-wish. *Arch Gynecol Obstet* 270: 133-146.
- 9) Deb K, Chaturvedi MM, Jaiswal YK. (2004b). Gram-negative bacterial endotoxin-induced infertility: a birds eye view. *Gynecol Obstet Invest* 57: 224-232.
- 10) Donders GG, Vereecken A, Bosmans E, Dekeersmaecker A, Salembier G, Spitz B. (2002). Definition of a type of abnormal vaginal flora entity that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis. *BJOG* 109: 34-43.
- 11) Flores Olivares CA, Fiorentino MA, Cano A, Louge E, Moreira AR, Ramírez-Vasquez RA, Manes J. (2014). Efectos de *Escherichia coli* aislada de casos de vaginitis sobre la calidad espermática en ovinos. I Simposio Latinoamericano de Reproducción Animal. Viña del Mar, Chile.
- 12) Fraczek M, Kurpisz M. (2007). Inflammatory mediators exert toxic effects of oxidative stress on human spermatozoa. *J Androl* 28: 325-333.
- 13) García Pintos G. (2009). Plan estratégico nacional para el rubro ovino 2009-2015. *Lananoticias* 37:2-5.

- 14) Gaston-Parry O, Heasman K, Neomarin JKE, Robinson TJ. (1988). A radioimmunoassay for fluorogestone acetate (FGA) and its application to the measurement of plasma FGA and progesterone in ewes treated with FGA-impregnated intravaginal sponges. *Aust J Biol Sci* 41: 57-67.
- 15) Gatti M, Zunino P, Ungerfeld R. (2011). Changes in the aerobic bacterial mucous load after treatment with intravaginal sponges in anoestrous ewes: effect of medroxyprogesterone acetate and antibiotic treatment use. *Reprod Dom Anim* 46: 205-208.
- 16) Gil J. (2006). Inseminación artificial en ovinos. En: Melibea-Ungerfeld, R. (ed.), *Reproducción en animales domésticos*. Montevideo, Uruguay. Pp. 319-338.
- 17) Gorga F, Galdiero M, Buommino E, Galdiero E, (2001). Porins and lipopolysaccharide induce apoptosis in human spermatozoa. *Clin Diagn Lab Immunol* 8: 206-208.
- 18) Greyling JPC, Kotze WF, Taylor GJ, Hagendijk WJ, Cloete F. (1994). Synchronization of oestrus in sheep: use of different doses of progesteron outside the normal breeding season. *S Afr J Anim Sci* 24: 33-37.
- 19) Hansel W, Convey EM. (1983). Physiology of the estrous cycle. *J Anim Sci* 57: 404-424.
- 20) Hawk HW, Conley HH. (1971). Loss of spermatozoa from the reproductive tract of the ewe and intensification of sperm breakage by progestagen. *J Reprod Fert* 27: 339-347.
- 21) Hawk HW, Conley HH. (1972). Investigations of sperm transport failure in ewes administered synthetic progesterone. *J Anim Sci* 34: 609-613.
- 22) Hawk HW, Cooper BS, Pursell VG. (1981). Increased sperm death in the cervix and uterus of estrous ewes after regulation of estrus with prostaglandin or progestogen. *J Anim Sci* 52: 601-610.
- 23) Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams, ST. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth Ed Williams and Wilkins. Baltimore, USA.
- 24) Iglesias D. (2013). Análisis de la cadena de carne ovina en Argentina. Estudios socioeconómicos de los sistemas agroalimentarios y agroindustriales N°11. Ed. INTA. Argentina.
- 25) Johnson SK, Dailey RA, Inskeep EK, Lewis PE. (1996). Effect of peripheral concentrations of progesterone on follicular growth and fertility in ewes. *Dom Anim Endocr* 13: 69-79.

- 26) Laurusevicius SA, Siugzdaite J, Zilinskas H. (2008). Correlation between different sexual cycle stages and vaginal bacterial flora in bitches of different breeds. *Vet Zoot* 41: 76-79.
- 27) Lewis GS. (2003). Steroidal regulation of uterine resistance to bacterial infection in livestock. *Reprod Biol Endocrinol* 1: 117.
- 28) Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. (2009). Brock. *Biología de los microorganismos*.
- 29) Manes J, Fiorentino MA, Hozbor F, Paolocchi F, Alberio R, Ungerfeld R. (2013) Changes in the aerobic vaginal bacteria load and antimicrobial susceptibility after different oestrous synchronization treatments in goats. *Anim Prod Sci* 53: 555–559.
- 30) Martins G, Figueira L, Penna B, Brandao F, Vargas R, Vasconcelos C, Lilenbaum W. (2009) Prevalence and antimicrobial susceptibility of vaginal bacteria from ewes treated with progestin-impregnated intravaginal sponges. *Small Rumin Res* 81: 182–184.
- 31) Martins LT, Dos Santos Neto PC, Neto SG, Pereira Rauber L, Bertolini M, Diniz Vieira A, Mezzalira A. (2010) Microbiological and functional evaluation of an alternative device (OB®) for estrous synchronization in ewes. *Ciencia Rural* 40: 389–395.
- 32) Menchaca A, Rubianes E. (2004). New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reprod Fert Dev* 16: 403-414.
- 33) Narushima S, Itoh K, Sankai T, Takasaka M, Otani I, Yoshikawa Y. (1997). Changes in normal vaginal flora of African green monkey (*Cercopithecus aethiops*) during the menstrual cycle. *Exp Anim* 46: 47-52.
- 34) Noguchi K, Tsukumi K, Urano T. (2003). Qualitative and Quantitative Differences in Normal Vaginal Flora of Conventionally Reared Mice, Rats, Hamsters, Rabbits, and Dogs. *Comp Med* 53: 404-412.
- 35) Oliveira JK, Martins G, Esteves LV, Penna B, Hamond C, Fonseca JF, Rodrigues AL, Brandao FZ, Lilenbaum W. (2013). Changes in the vaginal flora of goats following a short-term protocol of oestrus induction and synchronization with intravaginal sponges as well as their antimicrobial sensitivity. *Small Rumin Res* 113: 162-166.
- 36) Orizabal-Chávez B, Alba-Jasso GA, Ocharán-Hernández ME (2013). Farmacocinética de la progesterona. *Rev Hosp Jja Mex* 80: 59-66.
- 37) Padula AM, Macmillan KL. (2006). Effect of treatment with two intravaginal inserts on the uterine and vaginal microflora of early postpartum beef cows. *Aust Vet J* 84:

- 204-208.
- 39) Pineda M.H. (2003). Female Reproductive System. Veterinary Endocrinology and Reproduction. In: Pineda, M.H. (Ed.). Iowa State Press, Iowa, pp: 293-341.
- 40) Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SSK, McCulle SL. (2011). Vaginal microbiome of reproductive age women. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 4680–4687.
- 41) Robinson TJ. (1956). The artificial insemination of the Merino sheep following the synchronization of oestrus and ovulation by progesterone injected alone and with pregnant Mare Serum Gonadotrophin (PMSG). *Aust J Agric Res* 3: 194 – 210.
- 42) Robinson TJ. (1968). The synchronization of the estrous cycle and fertility. Sixth International Congress on Animal Reproduction, Paris 2, 1347.
- 43) Rubianes E, de Castro T, Kmaid S. (1998). Estrous response after a short progesterone priming in seasonally anestrous goats. *Theriogenology* 49: 356 (abstract).
- 44) Rubianes E, Ungerfeld R, de Castro T. (1999). Inducción y sincronización de celo en ovejas y cabras. III Simposio Internacional de Reproducción Animal IRAC, Córdoba, Argentina. Pp. 109-132.
- 45) Rubianes E, Menchaca A, Ungerfeld R. (2001). Avances en las técnicas de sincronización de celos en ovinos y caprinos. Cuarto Simposio Internacional de Reproducción Animal pp. 61-71.
- 46) Salomon S, Maxwell WMC. (2000) Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci* 62: 77-111.
- 47) Sargison ND, Howie F, Mearns R, Penny CD, Foster G. (2007). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* as a perennial cause of abortion in a closed flock of Suffolk ewes. *Vet Rec* 160: 875-876.
- 48) Savage DC. (1972). Associations and physiological interactions of indigenous microorganisms and gastrointestinal epithelia. *Am J Clin Nutr* 25: 1372-1379.
- 49) Schulz M, Sanchez R, Soto L, Risopatron J, Villegas J. (2010). Effect of *Escherichia coli* and its soluble factors on mitochondrial membrane potential, phosphatidylserine translocation, viability, and motility of human spermatozoa. *Fertil and Steril* 94: 619-623.
- 50) Sawyer GJ. (1977). Observation on the bacterial population of the cervix of the ewe before and after embryo death. *Aust Vet J* 53: 542-544.
- 51) Scudamore CL. (1988). Intravaginal sponge insertion technique. *Vet Rec* 123: 554 (Abstract).
- 52) Sheldon M, Lewis G, LeBlanc S, Gilbert RO. (2006). Defining postpartum uterine

- disease in cattle. *Theriogenology* 65: 1516-1530.
- 53) Shelton JN. (1965). Identification of progestagens of high activity for control of the oestrus cycle in the sheep. *Nature* 206: 156-158.
- 54) Suárez G, Zunino P, Carol H, Ungerfeld, R. (2006). Changes in the aerobic vaginal bacterial mucous load and assessment of the susceptibility to antibiotics after treatment with intravaginal sponges in anestrus ewes. *Small Rumin Res* 63: 39-43.
- 55) Swartz, JD, Lachman M, Westveer K, O'Neill T, Geary T, Kott RW, Berardinelli JG, Hatfield PG, Thomson JM, Andy Roberts A, Yeoman CJ. (2014). Characterization of the vaginal microbiota of ewes and cows reveals a unique microbiota with low levels of lactobacilli and near-neutral pH. *Front Vet Sci* 1: 1-10.
- 56) Ungerfeld R, Rubianes E. (2002). Short term with medroxi-progesterone impregnated sponges for eCG-estrus induction in anestrus ewes. *Small Rumin Res* 46: 63-66.
- 57) Ungerfeld R, Forsberg M, Rubianes E. (2004). Overview of the response of anoestrous ewes to the ram effect. *Reprod Fert Dev* 16: 479-490.
- 58) Vigue RF, Fitzgerald WH, Castrucci RF. (1959). Management of bovine genital infections. I. Intravaginal therapy. *J Am Vet Med Ass* 134: 308-311.
- 59) Viñoles C, Meikle A, Forsberg M, Rubianes E. (1999). The effect of subluteal levels of exogenous progesterone on follicular dynamics and endocrine patterns during the early luteal phase of the ewe. *Theriogenology* 51: 1351-1361.
- 60) Viñoles C, Paganoni B, Milton JTB, Driancourt MA, Martin GB. (2011). Pregnancy rate and prolificity after artificial insemination in ewes following synchronization with prostaglandin, sponge, or sponges with bactericide. *Anim Prod Sci* 51: 565-569.
- 61) Yániz JL, Marco-Aguado MA, Mateos JA, Santolaria P. (2010) Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effects on sperm quality during storage at 15°C. *Anim Reprod Sci* 122: 142-149.

10. Anexos

ACTA DE EXAMEN

CURSO: Defensa de Tesis de Doctorado

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: Montevideo, 18 de diciembre de 2015

TRIBUNAL: Dr. Pablo Zunino (Presidente), Dr. Víctor Parraguez, Dr. Edgardo Rubianes, Dr. Gonzalo Suárez, Dr. Marcelo Rodríguez Piñón

CI ESTUDIANTE	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
25.524.631 (ARG)	MANES, Jorgelina	S.S.S.	12

PRESENTADOS	NO PRESENTADOS	APROBADOS	APLAZADOS	INSCRIPTOS
1	0	1	0	1

TRIBUNAL

Dr. Pablo Zunino (Presidente)

Dr. Víctor Parraguez

Dr. Edgardo Rubianes

Dr. Gonzalo Suárez

Dr. Marcelo Rodríguez Piñón

FIRMA



NOTA: La calificación mínima para aprobar el examen es B.B.B (6)