



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

**“EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE CARBETOCINA (Cb) Y/O
DIMETILSULFÓXIDO (DMSO) SOBRE LA PENETRABILIDAD CERVICAL DE LA
OVEJA AL MOMENTO DE LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL”**

Por

ÁLVAREZ GONZÁLEZ, Guillermo
FERNÁNDEZ ZANETTI, Gabriel
MEDINA MEDEROS, Emanuel

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
2023**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:



Dr. Danilo Fila

Segundo miembro (tutor):



Dr. Marcelo Rodríguez Piñón

Tercer miembro:



Dra. Florencia Beracochea

Cuarto miembro (co-tutor):



Aux Farm. Gonzalo García Barcelo

Fecha: 6 de octubre 2023

Autores:



Br. Guillermo Álvarez González



Br. Gabriel Fernández Zanetti



Br. Emanuel Medina Mederos

AGRADECIMIENTOS

Queremos brindar nuestros más sinceros agradecimientos al Dr. Marcelo Rodríguez Piñón y al Auxiliar de Farmacología Gonzalo García, tutor y co tutor respectivamente por la dedicación, apoyo, confianza, paciencia y respeto hacia nosotros. Sin ellos nada de esto sería posible

Agradecer a la directora del Campo experimental N°1 de Facultad de Veterinaria, Udelar, Dra. Carla Faliveni por permitirnos utilizar con total comodidad las instalaciones con las que allí cuenta y estar siempre a disposición nuestra. También extendemos el agradecimiento a todo el personal que trabaja en el Campo experimental.

A la Dra. Alina De Cuba que también formó parte del experimento también vaya nuestro agradecimiento.

A nuestra casa de estudios, a la vieja pero tan querida Facultad de Veterinaria, que nos abrió las puertas y nos brindó todas las herramientas para nuestra formación como futuros profesionales y que sin duda formará parte para el resto de nuestras vidas.

A nuestras familias por el apoyo brindado, pilares fundamentales que nos acompañaron en todo el proceso apoyándonos, confiando en nosotros para que podamos llegar a destino. A los que están y a los que ya no.

A nuestros amigos y compañeros por estar siempre.

¡A todos muchas gracias!

TABLA DE CONTENIDO

Página

PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE FIGURAS	5
RESUMEN.....	7
SUMMARY	8
1. INTRODUCCIÓN	9
2. REVISION BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1 Uruguay y su producción ovina	11
2.2 Inseminación artificial	11
2.3 El cérvix como limitante en la IA en ovinos.....	12
2.4 Estrategias para aumentar la penetrabilidad del cérvix ovino	13
2.4.1 Métodos físicos para la dilatación del cérvix ovino	14
2.4.2 Métodos hormonales para la dilatación del cérvix ovino	15
2.5 El Dimetilsulfóxido como posible agente inductor de la dilatación cervical en ovinos ..	16
3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS	18
3.1 Hipótesis.....	18
3.1.1 Hipótesis I.....	18
3.1.2 Hipótesis II.....	18
3.2 Objetivos general y específicos	19
3.2.1 Objetivo general.....	19
3.2.2 Objetivos específicos	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS	19
4.1 Análisis estadístico	22
5. RESULTADOS	22
6. DISCUSIÓN	26
7. CONCLUSIÓN.....	28
8. BIBLIOGRAFIA.....	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Clasificación morfológica del cérvix de ovejas adultas según el grado de complejidad estructural y su relación con la profundidad de penetración cervical: a) grado 1, cervices con anillos cervicales (Ac) completos y alineados entre sí; b) grado 2, cervices con algunos anillos completos y alineados entre sí (como los de grado 1) y con anillos incompletos y desalineados; c) grado 3, cervices mayoritariamente con anillos incompletos y desalineados. Las flechas indican la dirección y el máximo de profundidad cervical que se puede alcanzar de acuerdo al grado de complejidad de la anatomía del cérvix (Kershaw y col., 2005, modificado por Candappa y Bartlewski, 2012).

Figura 2: Estructura química del dimetilsulfóxido (DMSO) (Pubchem, National Library of Medicine, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/dimethylsulfoxide#section=Information-Sources>).

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 (Gurtovenko, Anwar, 2007).

Figura 4: Línea de tiempo que muestra la secuencia del trabajo involucrando sincronización de la ovulación, momento de la aplicación del DMSO y/o Cb y los momentos de medición de la penetrabilidad cervical.

Figura 5: Representación de la cánula de medición de penetrabilidad graduada cubierta por su manga protectora.

Figura 6: Descripción grafica de la secuencia de medición de penetrabilidad mediante el uso de vaginoscopio, cánula de medición graduada cubierta por su manga protectora y el posterior registro de la medida máxima obtenida.

Figura 7. Penetrabilidad cervical absoluta (cm, media \pm sem) a las 0, 42, 54 y 66 h post eCG de ovejas Corriedale tratadas con 100 μ g (2 mL) de Cb (Decomotón, Laboratorios Callier, Uruguay; grupos Cb y Cb+DMSO, n=5 y n=7, respectivamente) y/o DMSO 2 % (1 mL) en glicerina en forma tópico intra vaginal (Carlo Erba, N° lote P1C024121D; grupos DMSO y Cb+DMSO, n=6 y n=7, respectivamente) y suero fisiológico i/m (2 mL) y glicerina intravaginal (1 mL) (grupo Control, C, n=6), 12 h antes del momento esperado de la inseminación artificial a tiempo fijo (42 h post eCG) luego de la sincronización de la ovulación con esponjas impregnadas en MAP y eCG i/m. Diferentes letras indican diferencia significativas entre h post eCG con una p<0,0001.

Figura 8. Penetrabilidad cervical relativa (diferencia entre la penetrabilidad a las 42 h, 54 h y 66 h post eCG y la penetrabilidad inicial a las 0 h post eCG) (cm) de ovejas

Corriedale tratadas con 100 µg (2 mL) de Cb (Decomotón, Laboratorios Callier, Uruguay; grupos Cb y Cb+DMSO, n=5 y n=7, respectivamente) y DMSO 2 % (1 mL) en glicerina en forma tópico intra vaginal (Carlo Erba, N° lote P1C024121D; grupos DMSO y Cb+DMSO, n=6 y n=7, respectivamente) y suero fisiológico i/m (2 mL) y glicerina intravaginal (1 mL) (grupo Control, C, n=6), 12 h antes del momento esperado de la inseminación artificial a tiempo fijo luego de la sincronización de la ovulación con esponjas impregnadas en MAP y eCG i/m (42 h post eCG). Diferentes letras indican diferencias significativas entre h post eCG con una $p < 0,0001$. El asterisco indica una tendencia a ser diferentes entre h post eCG con una $P = 0,0898$.

Figura 9. Incremento de la Penetrabilidad cervical (diferencia entre la penetrabilidad en los intervalos 0 a 42 h, 42 a 54 y 54 a 66 h post eCG), (cm) de ovejas Corriedale tratadas con 100 µg (2 mL) de Cb (Decomotón, Laboratorios Callier, Uruguay; grupos Cb y Cb+DMSO, n=5 y n=7, respectivamente) y/o DMSO 2 % (1 mL) en glicerina en forma tópico intra vaginal (Carlo Erba, N° lote P1C024121D; grupos DMSO y Cb+DMSO, n=6 y n=7, respectivamente) y suero fisiológico i/m (2 mL) y glicerina intravaginal (1 mL) (grupo Control, C, n=6), 12 h antes del momento esperado de la inseminación artificial a tiempo fijo luego de la sincronización de la ovulación con esponjas impregnadas en MAP y eCG i/m (42 h post eCG). Diferentes letras indican diferencia significativas entre grupos para un mismo intervalo con una $p < 0,05$.

RESUMEN

En el presente experimento se propone la administración de Dimetilsulfóxido (DMSO) al 2 % y un análogo sintético de Oxitocina (Carbetocina, Cb.) 12 h antes del momento de la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF), con el propósito de inducir la dilatación del cuello uterino de ovejas de raza Corriedale, con el objetivo de aportar al desarrollo de estrategias que contribuyan a facilitar la inseminación artificial transcervical y aumentar así la eficiencia reproductiva de la especie.

Se pesaron e identificaron 28 ovejas Corriedale las cuales fueron tratadas con la administración intravaginal de una esponja impregnada con 60 mg de medroxiprogesterona MAP (Zoetis, Buenos Aires, Argentina) durante 7 días y, a su retiro, se administraron 300 UI de eCG i.m. (ECEGON® 5000, Biogénesis Bagó, Buenos Aires, Argentina) para sincronizar la ovulación. Las ovejas fueron distribuidas aleatoriamente en 4 grupos experimentales (n=7 cada grupo) con un diseño factorial 2x2 y tratadas a las 12 h antes de la IATF (42 h post-eCG). El grupo control fue tratado con suero fisiológico i/m (2 mL) y glicerina intravaginal (1 mL), ambos administrados como placebo. Otro grupo fue tratado con 100 µg (2 mL) de Cb (Decomotón, Laboratorios Callier, Uruguay). Un tercer grupo fue tratado con DMSO 2 % (1 mL) (Carlo Erba, N° lote P1C024121D) en glicerina como medio tópico intra vaginal, lo más cercano posible al orificio cervical caudal. El cuarto grupo fue tratado con Cb y DMSO de idéntica forma que los dos grupos anteriores.

La penetrabilidad cervical se midió al momento de retirar las esponjas y administrar eCG (0 h post eCG), al momento del tratamiento con Cb y/o DMSO (42 h post eCG), al momento esperado de la IATF (54 h post eCG) y 12 h después del momento esperado de la IATF (66 h post-eCG) mediante la utilización de una cánula de transferencia de embriones de uso bovino de punta roma, graduada, cubierta con una manga protectora. Los resultados fueron analizados por el Procedimiento Mixto para el análisis de Varianza de SAS (Proc. Mixed, Statistical Analysis Systems SAS Institute, Cary, NC, EEUU, 2000)

Durante las primeras 12 h después de la administración de los tratamientos para la inducción de la dilatación cervical, los grupos tratados con DMSO mostraron un mayor incremento en la penetrabilidad respecto a los que no fueron tratados con DMSO ($0,44 \pm 0,11$ cm vs $0,12 \pm 0,11$ cm, respectivamente, $p < 0,05$). El grupo tratado con DMSO + Cb tuvo mayor incremento de penetrabilidad que el grupo tratado solo con Cb ($0,59 \pm 0,15$ cm vs $0,0 \pm 0,17$ cm, respectivamente, $p < 0,09$). Los datos sugieren que el DMSO podía ser una alternativa de tratamiento para facilitar la canulación transcervical y aumentar la fertilidad en ovinos.

SUMMARY

In the present experiment, is proposed the administration of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) at 2% and a synthetic analogue of Oxytocin (Carbetocin, Cb.) 12 hours before at the time of fixed-time artificial insemination (FTAI), with the aim of inducing neck dilation of Corriedale sheep, with the objective of contributing to the development of strategies that contribute to facilitating transcervical artificial insemination and thus increasing the reproductive efficiency of the species.

Twenty-eight Corriedale ewes were weighed and identified, which were treated with the intravaginal administration of a sponge impregnated with 60 mg of medroxyprogesterone MAP (Zoetis, Buenos Aires, Argentina) for 7 days and, upon removal, the administration of 300 IU of eCG i.m. (ECEGON® 5000, Biogénesis Bagó, Buenos Aires, Argentina) to synchronize ovulation.

The sheep were randomly distributed into 4 experimental groups (n=7 each group) with a 2x2 factorial design and treated 12 h before the IATF (42 h post-eCG). The control group was treated with saline i/m (2 mL) and intravaginal glycerin (1 mL), both administered as placebo. The second group was treated with 100 µg (2 mL) of Cb (Decomotón, Laboratorios Callier, Uruguay). The third group was treated with 2% DMSO (1 mL) (Carlo Erba, lot number P1C024121D) in glycerin as a topical intravaginal medium, as close as possible to the caudal cervical os. The fourth group was treated with Cb and DMSO in the same way as the two previous groups.

Cervical penetrability was measured at the time of removing the sponges and administering eCG (0 h post eCG), at the time of treatment with Cb and/or DMSO (42 h post eCG), at the expected time of the FTAI (54 h post eCG) and 12 h after the expected time of FTAI (66 h post-eCG) using a graduated, blunt-tipped bovine embryo transfer cannula covered with a protective sleeve. The results were analyzed by the Mixed Procedure for the analysis of Variance of SAS (Proc. Mixed, Statistical Analysis Systems SAS Institute, Cary, NC, USA, 2000).

During the first 12 h after the administration of the treatments for the induction of cervical dilatation, the groups treated with DMSO showed a greater increase in penetrability compared to those that were not treated with DMSO (0.44 ± 0.11 cm vs 0.12 ± 0.11 cm, respectively, $p<0.05$). The group treated with DMSO + Cb have a greater increase in penetrability than the group treated only with Cb (0.59 ± 0.15 cm vs 0.0 ± 0.17 cm, respectively, $p<0.09$). The data suggest that DMSO could be a treatment alternative to facilitate transcervical cannulation and increase fertility in sheep.

1. INTRODUCCIÓN

La producción ovina ha sido una de las grandes protagonistas en la historia del desarrollo económico y social del Uruguay. Durante mucho tiempo fue el principal rubro proveedor de divisas del país; jugó un papel fundamental en el aprovisionamiento de materia prima, base de nuestra industria textil nacional y de las principales fuentes alimenticias que tiene nuestro entorno rural hasta el día de hoy (Secretariado Uruguayo de la Lana (SUL), 2019). Sin embargo, el stock total del ganado ovino ha disminuido en los últimos 30 años, de unos 24.5 millones de cabezas en los años 90 a 6.2 millones al año 2022 (Sistema Nacional de Información Ganadera (SNIG), 2022). Actualmente, “la cadena ovina nacional continúa ubicándose como un rubro de importancia en la estructura exportadora del Uruguay, a través de la generación y la comercialización de productos de calidad que generan ingresos al país” (Rocanova, 2022). En el escenario de un potencial crecimiento del rubro, sería necesario un aumento del stock ovino, redirigiendo el potencial genético según la demanda del mercado. Para ello la inseminación artificial (IA) pasa a ser una de las herramientas reproductivas claves (Salamon y Maxwell, 2000).

Una de las limitantes para la aplicación a gran escala de la IA en los ovinos, es la baja fertilidad que presenta el semen de carnero al ser congelado y descongelado, estos efectos son causados por la crioconservación (Salamon y Maxwell, 2000). Otra de las limitantes que presenta la IA en la oveja es la dificultad de atravesar el cérvix y alcanzar la luz uterina por vía transcervical; a diferencia de la vaca, en la cual este procedimiento se realiza con facilidad. Esto es debido al menor tamaño corporal y a las particularidades anatómicas del tracto reproductivo ovino (Vilariño y Menchaca, 2007) lo que dificulta el paso transcervical de una pipeta inseminante para lograr la inseminación intrauterina (Salamon y Maxwell, 2000; Halbert, Dobson, Walton, Sharpe y Buckrell, 1990; Kershaw et al., 2005). Sin embargo, se puede aumentar la tasa de concepción utilizando la canulación transcervical asociada al uso de semen congelado. Se ha postulado que por cada centímetro que la cánula ingresa al cérvix, la tasa de concepción aumentaría en un 10% (Buckrell, 2000; Salamon y Maxwell 2000).

Al utilizar esta herramienta reproductiva, es fundamental tener presente los procesos fisiológicos del animal según la etapa del ciclo estral en la que se encuentre. El momento de máxima penetración cervical en el período preovulatorio, coincide con altas concentraciones de estradiol (Falchi, Taema, La Clanche y Scaramuzzi, 2012). En dicho momento, aumenta la sensibilidad del cérvix a los estrógenos (E2) y a la Oxitocina (Ox), mediante un aumento en la concentración de sus receptores (Rodríguez Piñón, 2015). A su vez, la Ox produce la liberación de Prostaglandina-E2 (PGE2), un inductor de la dilatación cervical (Fuchs, Graddy, Kowalski y Fields, 2002). Se ha visto entonces, que éstas hormonas podrían ser las responsables de la relajación del cérvix, mediante cambios cualitativos y cuantitativos en la composición de la matriz extracelular cervical. Entre los cuales, la desagregación y/o la

degradación activa del colágeno sería uno de los factores más importantes (Falchi et al., 2012; Rodríguez Piñón, 2015). Particularmente, se ha responsabilizado a las Metaloproteinasas de la Matriz Extracelular o MMPs de gran parte de estas modificaciones que sufre el colágeno cervical (Hulboy, Rudolph y Matrisian, 1997). Estas enzimas son colagenasas, que se activan normalmente en el cérvix de la oveja en la fase folicular, en particular la MMP subtipo 2 (MMP-2); contribuyendo en la activación de los procesos que darán lugar a la dilatación cervical (Rodríguez Piñón, 2015). Teniendo en cuenta los cambios fisiológicos y anatómicos que fueron previamente descritos se han realizado trabajos administrando Ox y/o PGE2 para lograr dilatar el cérvix y facilitar su canulación de forma artificial pero los mismos han arrojado, resultados contrapuestos (Rodríguez Piñón, 2015).

La Ox natural, tiene una vida media corta 15-30 min., lo que dificulta remedar farmacológicamente la secreción pulsátil natural de la hormona. Hoy en día se cuenta con la Carbetocina (Cb), un análogo sintético de larga duración de la Ox que tiene una vida media que es 4 a 10 veces más prolongada que la Ox natural (Fabián, Forsling y Jones, 1969; Sweeney et al., 1990). La acción prolongada de la Cb en comparación con la Ox permitiría evitar el uso de dosis repetidas o suprafisiológicas de Ox natural (Atke y Vilhardt, 1987; Rath, 2009) 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). Resultados obtenidos en nuestro laboratorio han mostrado que la Cb, administrada 12 h antes del momento esperado de la IA (42 h post eCG), aumentó aproximadamente 1 cm la penetrabilidad cervical respecto a los animales no tratados (1,5 cm vs. 0,6 cm, respectivamente, $P < 0,05$). Este aumento de la penetrabilidad cervical estuvo asociado a un aumento en la activación de la MMP-2 (Casuriaga, 2019).

Recientemente se ha descubierto otro compuesto que podría tener efectos directos sobre la dilatación cervical, el dimetilsulfóxido (DMSO). El 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 (Notman, Noro, O'Malley y Anwar, 2006). Su naturaleza anfifílica parece ser una importante característica definitoria de su acción sobre las membranas (Gurtovenko y Anwar, 2007). Como antecedente directo, De Cuba y Paiva (2021) realizaron un ensayo experimental *in vitro* donde se probó DMSO al 2%, en presencia o no de Cb, sobre la actividad de las formas latente y activa de la MMPs en explantes de cérvix ovino. En dicho ensayo se pudo apreciar que el DMSO aumenta la actividad de la MMP-2, fundamentalmente de su forma latente, sugiriendo que el DMSO induciría la liberación de la enzima al espacio intercelular del estroma. Si bien el mecanismo por el cual la Cb o el DMSO aumentan la capacidad gelatinolítica en el cérvix ovino no está dilucidado, podrían no ser el mismo, por lo cual no se puede descartar un efecto potenciador al utilizarlos en forma combinada.

En base ello, la hipótesis de la tesis fue que la administración intravaginal del DMSO al 2% aumenta la penetrabilidad cervical en ovejas y el uso combinado de éste con Cb potencia su efecto.

2. REVISION BIBLIOGRÁFICA

2.1 Uruguay y su producción ovina

La producción ovina ha sido una de los grandes protagonistas en la historia del desarrollo económico y social del Uruguay. Durante mucho tiempo fue el principal rubro proveedor de divisas del país y jugó un papel fundamental en el aprovisionamiento de materia prima, base de nuestra industria textil nacional y de las principales fuentes alimenticias que tiene nuestro entorno rural hasta hoy (Secretariado Uruguayo de la Lana (SUL), 2019). El stock total del ganado ovino ha disminuido de unos 24.5 millones de cabezas en los años 90 a 6.2 millones al año 2022 (SNIG, 2022).

El descenso del stock ovino se frenó en el año 2004, después de la importante crisis del precio de la lana que determinó una reducción histórica de la población ovina. La majada nacional presenta una estructura criadora, donde el 49,3 % del stock son ovejas, hace 10 años estas representaban un 40%, respondiendo esta tendencia hacia una orientación preferencial hacia la producción de carne con respecto a la de lana. Los productores ovejeros en el Uruguay, se caracterizan por su escala reducida en términos del área productiva que manejan y de su ubicación geográfica con menor disponibilidad de infraestructura y servicios disponibles frente a los productores que desarrollan otros rubros. La producción ovina está concentrada (aprox. 70%) en áreas más marginales de producción (suelos de basalto y cristalino) donde otros rubros tienen dificultades para desarrollarse. (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), s.f..)

2.2 Inseminación artificial

La IA es una herramienta sencilla, ampliamente utilizada en la industria ganadera para incrementar la mejora genética, ya que permite aumentar la eficiencia reproductiva del macho genéticamente mejorado (Candappa y Bartlewski, 2012). Además, la IA asociada a la utilización de protocolos hormonales de sincronización de la ovulación (inseminación artificial a tiempo fijo, IATF), evita la detección del celo y concentra los partos (Fierro, Olivera, Gil, Durán, J y Durán, G., 2009).

La IA puede ser realizada con semen fresco, refrigerado o congelado. En la oveja, la IA con semen congelado debe ser realizada a nivel intrauterino ya que las tasas de

concepción luego de la inseminación intravaginal o intracervical rara vez superan el 50% (Salamon y Maxwell, 2000). Sin embargo, la IA intrauterina en la oveja es un procedimiento relativamente complejo ya que, a diferencia de otras especies como la vaca o la cabra, el acceso al útero por vía transcervical está restringido debido a la compleja anatomía del cérvix, que limita el pasaje de la cánula de inseminar (Halbert et al., 1990).

2.3 El cérvix como limitante en la IA en ovinos

El cérvix de la oveja es un órgano de 4 a 10 cm de longitud, caracterizado por la presencia de 4-7 anillos que ocluyen la luz del órgano (Fukui y Roberts, 1978). Es tubular y fibroso, compuesto principalmente de tejido conectivo con predominio de colágeno y músculo liso (Moré, 1984).

A lo largo del eje longitudinal del cérvix se pueden distinguir dos zonas que difieren desde el punto de vista anatómico: la zona cervical caudal, contigua a la vagina que se extiende desde el orificio cervical caudal hasta el tercer o cuarto anillo y la zona cervical craneal que se ubica desde el final del cérvix caudal hasta el inicio del útero (Moré, 1984; Halbert, Dobson, Walton y Buckrell, 1990). La zona cervical caudal es considerada la de mayor estrechamiento del cérvix, en esta zona se encuentra el segundo anillo cervical, caracterizado por un gran desarrollo y por estar desalineado con respecto al primero. Esta morfología, implica la existencia de espacios ciegos que dificultan la canulación al momento de inseminar (Fukui y Roberts, 1978). En contraposición, la zona cervical craneal se caracteriza por presentar anillos pequeños y alineados (Kershaw et al., 2005). La morfología del cérvix varía entre razas (Kaabi et al., 2006) y también entre individuos de una misma raza (Naqvi et al., 2005; Kershaw et al., 2005), lo que resulta en diferentes grados de profundidad de penetración cervical entre animales (Kershaw et 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 (Halbert et al., 1990; Campbell, Harvey, McDonald y Sparksman, 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 (Eppleston, Salamon, Moore y Evans, 1994).

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 centímetro (Eppleston et al., 1994) y es máxima cuando se hace directamente en la luz uterina (IA uterina) (Sayre y Lewis, 1997), por lo cual el cérvix constituye una dificultad para la IA transcervical. El acceso al útero en forma transcervical es la alternativa que genera mayor expectativa (Salamon y Maxwell, 2000),.

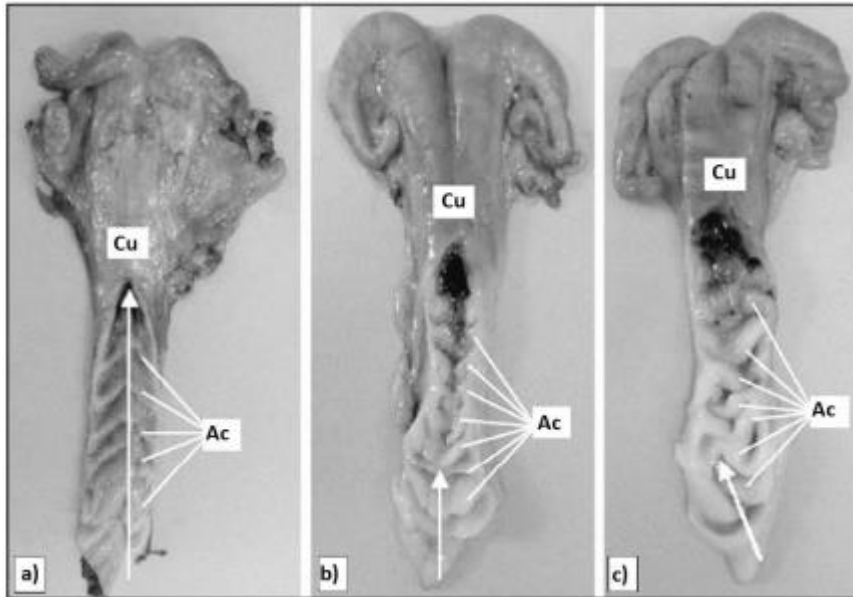


Figura 1. Clasificación morfológica del cérvix de ovejas adultas según el grado de complejidad estructural y su relación con la profundidad de penetración cervical: a) grado 1, cervices con anillos cervicales (Ac) completos y alineados entre sí; b) grado 2, cervices con algunos anillos completos y alineados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

2.4 Estrategias para aumentar la penetrabilidad del cérvix ovino

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 gonadotrofinas (GnRH) del hipotálamo, la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) de la hipófisis, el E2 y la inhibina de los folículos ováricos, la progesterona (P4) y la oxitocina del cuerpo lúteo y la prostaglandina F2 α (PGF2 α) 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) (Goodman, 1994). 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 P4 y finaliza con la luteólisis. (Goodman, 1994).

El cérvix se hace permeable en dos situaciones reproductivas particulares: durante el estro, permitiendo el ascenso de los espermatozoides y durante el parto, permitiendo el descenso y la expulsión del feto (Heydon y Adams, 1979). El momento de máxima penetración cervical en el período preovulatorio coincide con altas concentraciones de LH y estradiol, que sugieren que podrían ser responsables de la relajación del cuello uterino, probablemente a través de una vía mediada por Ox y PGE2 (Falchi et al., 2012). Este entorno hormonal produciría cambios cualitativos y cuantitativos en la composición de la matriz extracelular cervical, desagregando y degradando activamente el colágeno, lo que produciría la dilatación del cérvix (Rodríguez Piñón 2015). En el tejido cervical, dicha señal hormonal se amplificaría en forma autócrina y/o parácrina mediante el sistema Ox/PGE2 (Stellflug et al., 2001; King et al., 2004; Candappa y Bartlewski, 2012). Además, durante el proceso de gestación y parto sufre cambios 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 Maradny et al., 1997). La coordinación de estos fenómenos depende de los E2 y la P4 actuando a través de sus receptores específicos (RE y RP, respectivamente) (Gorodeski, 1996; Stjernholm et al., 1996), directamente o a través de otras hormonas.

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 y Lewis, 2004) y la inducción hormonal a la dilatación cervical (Rodríguez Piñón, 2003 y 2006; Robinson et al., 2011; Candappa y Bartlewski, 2012).

2.4.1 Métodos físicos para la dilatación del cérvix ovino

En la oveja se han estudiado diferentes estrategias para incrementar la profundidad de deposición seminal a través del cérvix. Halbert et al. (1990; 1990a) evaluaron diferentes métodos de contención, espéculos, fórceps y cánulas de inseminar para su utilización en la IA transcervical. A partir de este trabajo, se diseñó una técnica de IA transcervical conocida como Guelph System que consiste en posicionar a la oveja en decúbito dorsal, conteniéndola en un dispositivo usualmente utilizado para despezuñar. Luego de posicionada la oveja, con la ayuda de un espéculo con luz se realiza la retracción del tejido que rodea al orificio cervical caudal por medio de fórceps y se realiza la canulación con la cánula descrita por Buckrell et al. (1994). Se observó que las tasas de preñez alcanzadas con este método fueron 60 a 80% con el uso de semen fresco y 40 a 70% con el uso de semen congelado depositado a nivel intrauterino (Buckrell et al., 1994). Sin embargo, se detectaron lesiones

cervicales asociadas a la tracción del cérvix y su canulación que podrían afectar negativamente el desempeño reproductivo y el bienestar de los animales (Campbell et al., 1996). Más recientemente, Fonseca et al. (2013, 2016) desarrollaron una técnica para la colecta de embriones que ha facilitado el acceso al útero en ovejas. La técnica se realiza con el animal parado, implica el uso de sedación leve y analgesia y consiste en la exteriorización del cérvix a través de la vagina aplicando movimientos suaves de tracción. De esta forma, el cérvix puede ser manipulado completamente a través de la vagina durante la canulación.

Además de estas técnicas, se han modificado y diseñado diferentes cánulas de inseminar basadas en la anatomía del cérvix ovino (Wulster-Radcliffe y Lewis, 2002; Wulster-Radcliffe et al., 2004; Leethongdee et al., 2007; Álvarez et al., 2012). Sin embargo, hasta el momento no se ha logrado validar un método eficiente de IA transcervical en la oveja.

2.4.2 Métodos hormonales para la dilatación del cérvix ovino

Con el objetivo de aumentar la penetrabilidad cervical en la oveja se ha estudiado también el efecto de la aplicación de diferentes hormonas sobre la dilatación cervical como el 17β estradiol (Wulster-Radcliffe, Costine y Lewis, 1999), la Ox (Khalifa, Sayre, y Lewis, 1992; Sayre y Lewis, 1997; Stellflug et al., 2001; King et al., 2004), prostaglandina E (PGE2) (Leethongdee et al., 2007; Candappa, Bainbridge, Price, Hourigan y Bartlewski, P., 2009) y la relaxina (Salamon y Lightfoot, 1967). Algunos trabajos han demostrado que la administración de Ox (Khalifa et al., 1992) y PGE2 previo a la IA (Leethongdee et al., 2007; Candappa et al., 2009; Candappa y Bartleski, 2014) ha facilitado la canulación cervical.

La dilatación cervical en la oveja al estro es favorecida por la activación E2 dependiente del sistema Ox/PGE2. La activación del sistema Ox/PGE2 induce a la relajación del músculo liso y la remodelación del colágeno cervical permitiendo la apertura del canal cervical al estro (Rodríguez Piñón, 2015). La degradación de las fibras de colágeno dependen de la actividad de las colagenasas, que integran la familia de las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs) (Hulboy et 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 proenzimas (forma latente, L) y luego secretadas a la MEC donde son activadas (forma activada, A) (Hulboy et al., 1997).

Se ha reportado que la utilización Ox administrada i.v o i.m previo a la IA disminuye las tasas de preñez y de parición en ovejas (Stellflug et al., 2001; King et al., 2004). La administración suprafisiológica de Ox aumenta la contractibilidad uterina (Houdeau et al., 2002; Sayre y Lewis, 1996), lo que podría afectar el transporte

normal de los espermatozoides a través del útero luego de la IA y generar menores tasas de fertilidad (Lightfoot, 1970). Considerando la vida media corta de la Ox (minutos), se desarrolló un análogo sintético de larga duración (12 h), la 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 oxiótico 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. 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). Además, mediante estudios *in vitro*, la incubación de explantes cervicales durante 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 tanto, dichos resultados sugieren que la Cb puede ser investigada como posible inductor de la dilatación cervical. Por otro lado, existen pocos reportes sobre la utilización de PG en la inducción hormonal de la dilatación cervical en ovejas. Mayoritariamente los trabajos indican que la utilización intravaginal de análogos de PGE1 (Misoprostol) y de PGE2 (Dinoprostone) de larga duración facilitan la canulación cervical en la oveja cuando son administradas antes de la IA o de la transferencia de embriones (Leethongdee et al., 2007; Candappa et al., 2009; Bartlewski y Candappa, 2015).

En función de lo anterior, la Ox y la PG han sido utilizadas para dilatar el cérvix y facilitar su canulación, administradas solas (Stellflug et al., 2001; King et al., 2004) o combinadas (Leethongdee et al., 2007; De Rossi et al., 2009; Falchi, et al., 2012).

2.5 El Dimetilsulfóxido como posible agente inductor de la dilatación cervical en ovinos

De Cuba y Paiva (2021) realizaron un ensayo experimental *in vitro* donde se probó DMSO al 2%, en presencia o no de Cb, sobre la actividad de las formas latente y activa de la MMPs en explantes de cérvix ovino. En dicho ensayo se pudo apreciar que el DMSO aumentaba la actividad de la MMP-2, fundamentalmente de su forma latente, sugiriendo que el DMSO induciría la liberación de la enzima al espacio intercelular del estroma. Si bien el mecanismo por el cual la Cb o el DMSO aumentan la capacidad gelatinolítica en el cérvix ovino no está dilucidada, podrían no ser el mismo, por lo que no se puede descartar un efecto potenciado al utilizarlos en forma combinada.

El DMSO es una pequeña molécula anfipática con un grupo sulfóxido hidrofílico y dos grupos metil hidrofóbicos (Figura 2). Se emplea ampliamente en biología celular

como eficaz potenciador de la penetración, fusógeno celular y crioprotector (Notman et al., 2006). Su naturaleza anfifílica parece ser una importante característica definitoria de su acción sobre las membranas (Gurtovenko y Anwar, 2007).

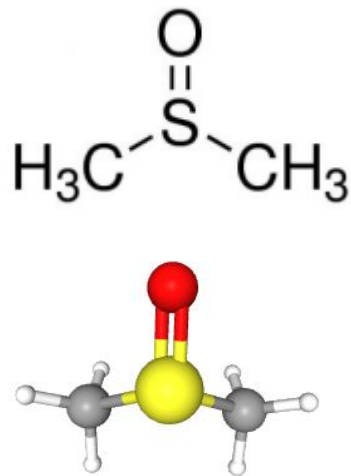


Figura 2. Estructura química del dimetilsulfóxido (DMSO) (Pubchem, National Library of Medicine, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/dimethylsulfoxide#section=Information-Sources>)

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 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 y Anwar, 2007) (Figura 3). Por tanto, el DMSO provoca que la membrana se vuelva más frágil y por consiguiente aumente la permeabilidad.

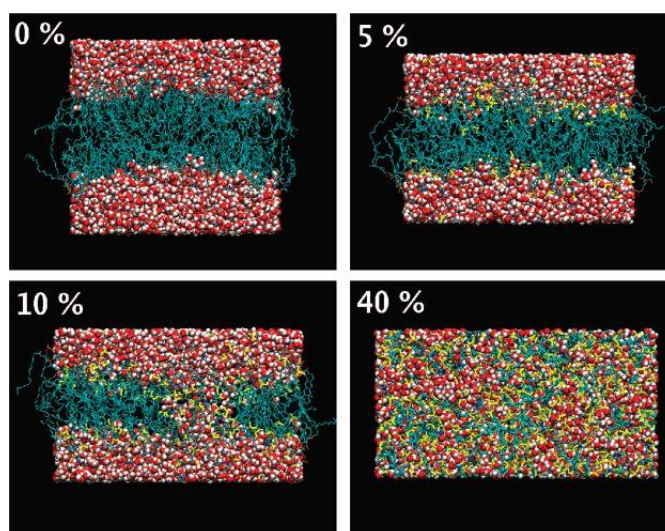


Figura 3. Distintos modos de acción de DMSO sobre membranas de fosfolípidos. Se presentan vistas laterales de las estructuras finales para los sistemas bicapa que contiene 0, 5, 10 y 40% en moles de DMSO (base libre de lípidos). Los lípidos se muestran en cian, el agua en rojo y DMSO en amarillo (Gurtovenko y Anwar, 2007).

3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS

3.1 Hipótesis

3.1.1 Hipótesis I

El DMSO intravaginal administrado 12 h. antes del momento esperado de la IA a tiempo fijo (IATF) produciría un aumento en la penetrabilidad cervical.

3.1.2 Hipótesis II

La administración conjunta de DMSO intravaginal y Cb i/m, 12 h. antes de la IATF, produciría un aumento en la penetrabilidad cervical mayor al obtenido con la aplicación de ambas drogas por separado.

3.2 Objetivos general y específicos

3.2.1 Objetivo general

- Determinar el efecto *in vivo* de la administración de Cb y/o DMSO sobre la penetrabilidad cervical en ovinos al estro, aportando evidencias para desarrollar un método de dilatación cervical farmacológico y facilitar la inseminación artificial.

3.2.2 Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la administración intravaginal de DMSO al 2% 12 h antes del momento de la IATF sobre la penetrabilidad cervical.
- Determinar el efecto combinado de la administración de Cb i.m. y DMSO al 2% intravaginal 12 h antes del momento de la IATF sobre la penetrabilidad cervical.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en el campo experimental N°1 de la Facultad de Veterinaria, Migués, Canelones, Uruguay, durante el mes de febrero (estación reproductiva) del año 2023. Se utilizaron 28 ovejas Corriedale (n=7 por grupo experimental) multíparas ciclando provenientes de la misma majada, con un peso homogéneo ($56,9 \pm 6,5$ kg, mean \pm sem) y una condición corporal entre 2,0 a 3,5 (mediana de 2,5) en la escala de 0-5 de Russel et al., 1969). Durante el experimento, las ovejas permanecieron pastoreando a campo natural y se les brindó fardo y agua *ad libitum*. El protocolo de experimentación fue aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA-FVet), Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay (N° 1514/22).

La ovulación fue sincronizada mediante la administración intravaginal de una esponja impregnada con 60 mg de medroxiprogesterona MAP (Zoetis, Buenos Aires, Argentina) durante 7 días y, a su retiro, la administración de 300 UI de eCG i.m. (ECEGON® 5000, Biogénesis Bagó, Buenos Aires, Argentina) (Figura 4).

La IATF de las ovejas se realizó 54 h luego de la administración de eCG (Olivera-Muzante, Fierro, López y Gil, 2011). Doce horas antes de la IATF (42 h post-eCG) (Candappa y Bartlewski 2014) las ovejas fueron tratadas con 100 μ g (2 mL) de Cb (Decomotón, Laboratorios Callier, Uruguay) y/o DMSO 2 % (1 mL) (Carlo Erba, N° lote P1C024121D) en glicerina en forma tópico intra vaginal (Figura 4). Dichas administraciones se realizaron lo más cercano posible al orificio cervical caudal. Las dosis utilizadas fueron determinadas en función de los experimentos anteriores (Casuriaga, 2019; De Cuba y Paiva, 2021).

Las hembras fueron adjudicadas a 4 grupos experimentales con un diseño factorial 2x2. Al grupo control se le administró suero fisiológico i/m (2 mL) y glicerina intravaginal (1 mL), ambos administrados como placebo, otro grupo fue tratado con Cb, otro con DMSO y un último grupo con la combinación de Cb+DMSO.

La penetrabilidad cervical se midió al momento de retirar las esponjas y administrar eCG (0 h post eCG), al momento del tratamiento con Cb y/o DMSO (42 h post eCG), al momento de la IATF (54 h post eCG) y 12 h después (66 h post eCG) (Figura 4).

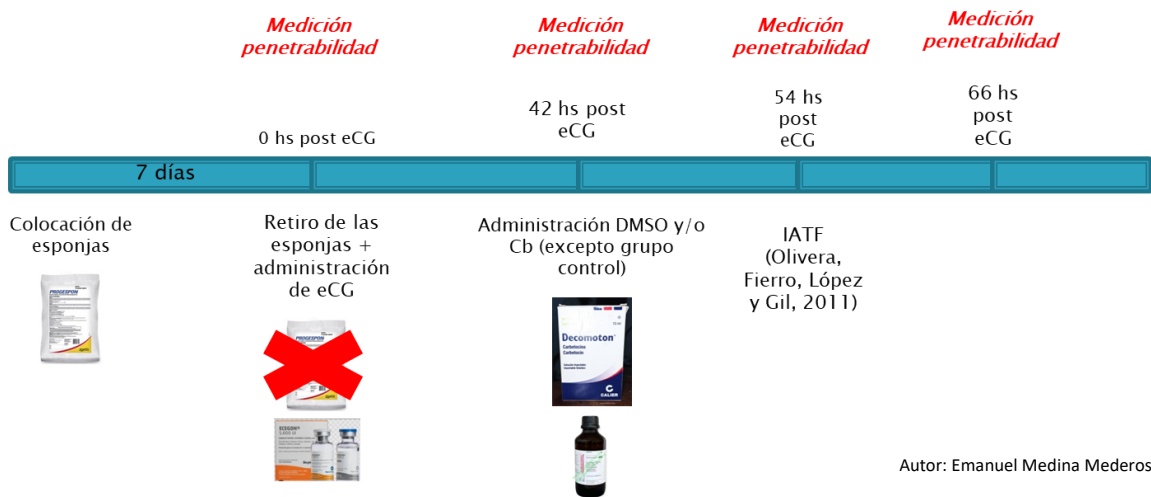


Figura 4: Línea de tiempo que muestra la secuencia del trabajo involucrando sincronización de la ovulación, momento de la aplicación del DMSO y/o Cb y los momentos de medición de la penetrabilidad cervical.

La penetrabilidad cervical (cm) se determinó utilizando una cánula de transferencia de embriones de uso bovino con punta roma de 3,2 mm de diámetro caudal, cubierta con una manga protectora. En el extremo posterior, se graduó la cánula con una escala de 0 a 7 cm con 1 mm de apreciación, de manera que el punto 0 esté ajustado al alinear los extremos anteriores de la cánula y la manga protectora (Figura 5).

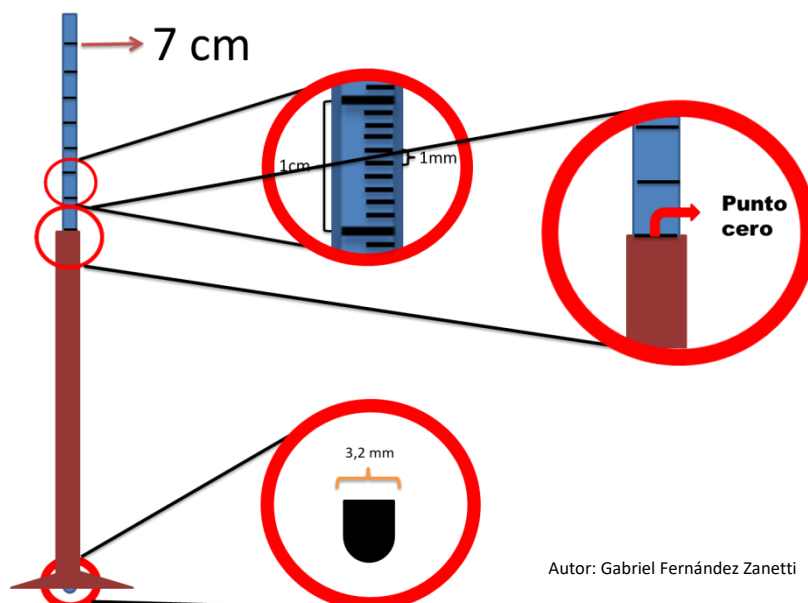


Figura 5: Representación de la cánula de medición de penetrabilidad graduada cubierta por su manga protectora.

Para la determinación de la penetrabilidad cervical, se colocaron las ovejas con sus cuartos traseros levantados sobre un caballete. Luego de que las ovejas fueron posicionadas, se introdujo un vaginoscopio lubricado con carboximetilcelulosa a través de la vulva hasta lograr la protrusión del orificio cervical caudal. Luego de la visualización del orificio cervical caudal, se comenzó a canular el cérvix aplicando movimientos suaves y rotatorios, manteniendo subjetivamente el mismo grado de fuerza entre animales. La cánula fue forzada a avanzar a través del cérvix hasta encontrar una resistencia que imposibilitó continuar la penetración, en ese momento se registró la medida de penetrabilidad que indicó la cánula graduada. Este proceso se repitió tres veces y se tomó en cuenta la mayor medida obtenida para cada animal (Figura 6). Además, se realizó una observación morfológica descriptiva de las estructuras visibles a través del vaginoscopio, para registrar potenciales efectos locales de la administración tópica del DMSO.

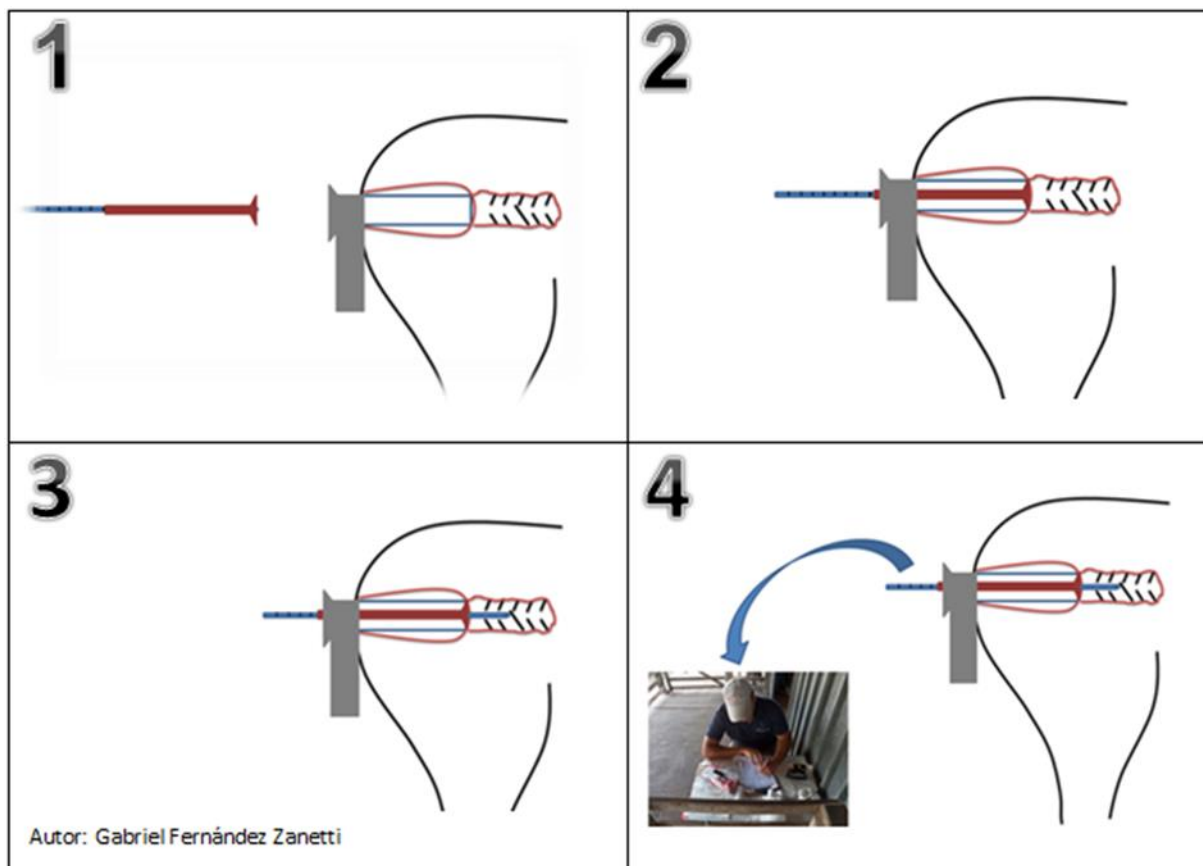


Figura 6: Descripción grafica de la secuencia de medición de penetrabilidad mediante el uso de vaginoscopio, cánula de medición graduada cubierta por su manga protectora y el posterior registro de la medida máxima obtenida.

4.1 Análisis estadístico

La Penetrabilidad cervical absoluta, la penetrabilidad cervical relativa (diferencia entre la penetrabilidad a las 42 h, 54 h y 66 h post eCG y la penetrabilidad inicial a las 0 h post eCG) y el Incremento de la penetrabilidad (diferencia entre la penetrabilidad en los intervalos 0 a 42 h, 42 a 54 y 54 a 66 h post eCG) se analizaron mediante un procedimiento mixto para ANOVA para muestras repetidas (Statistical Analysis Systems SAS Institute, Cary, NC, EEUU, 2000), incorporando al análisis el efecto fijo del tratamiento (DMSO y/o Cb), el momento de la medición (0, 42, 54 y 66 h post eCG) y la interacción entre ellos. La penetrabilidad cervical al momento de retirar las esponjas y administrar eCG (0 h post eCG), fue utilizada como covariable para analizar la penetrabilidad absoluta. Para el intervalo previo a los tratamientos con DMSO y/o Cb, el efecto fijo de los tratamientos se denominó efecto de agrupamiento. Los datos se presentan como medias \pm s.e.m., con diferencias consideradas significativas para $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

De los 28 animales experimentales, cuatro fueron eliminados del experimento. Uno de ellos registró valores de 1 cm de penetrabilidad absoluta en todas las mediciones. Otro dio una penetrabilidad mayor a 6 cm al momento del tratamiento de inducción a la dilatación (42 post eCG), por lo cual se interpretó que fue canulado hasta el útero (Halbert et al, 1990) y por lo tanto no sería posible evaluar el efecto de los tratamientos. Los otros dos registraron penetrabilidad absoluta menor a las 42 h post eCG que a las 0 h post eCG. Finalmente, los grupos quedaron con $n=6$, $n=6$, $n=5$ y $n=7$, para los grupos Control, DMSO, Cb y Cb+DMSO, respectivamente.

No se registraron efectos visibles de alteración de la mucosa vaginal ni del orificio cervical caudal tras la aplicación del DMSO, aunque si se registró la acumulación del vehículo (glicerina) en la mayoría de los animales, que obligó a su evacuación con sonda y aspiración con jeringa, para poder medir la penetrabilidad al momento esperado de la IA (54 h post eCG). El volumen colectado en la aspiración fue mayor, más del doble que el volumen administrado con el DMSO.

Penetrabilidad cervical absoluta

La Penetrabilidad cervical absoluta fue de $1,48 \pm 0,06$ cm ($n=96$) y fue afectada por la hora post eCG ($P < 0,0001$) y el tratamiento con DMSO ($P < 0,03$) (Figura 7).

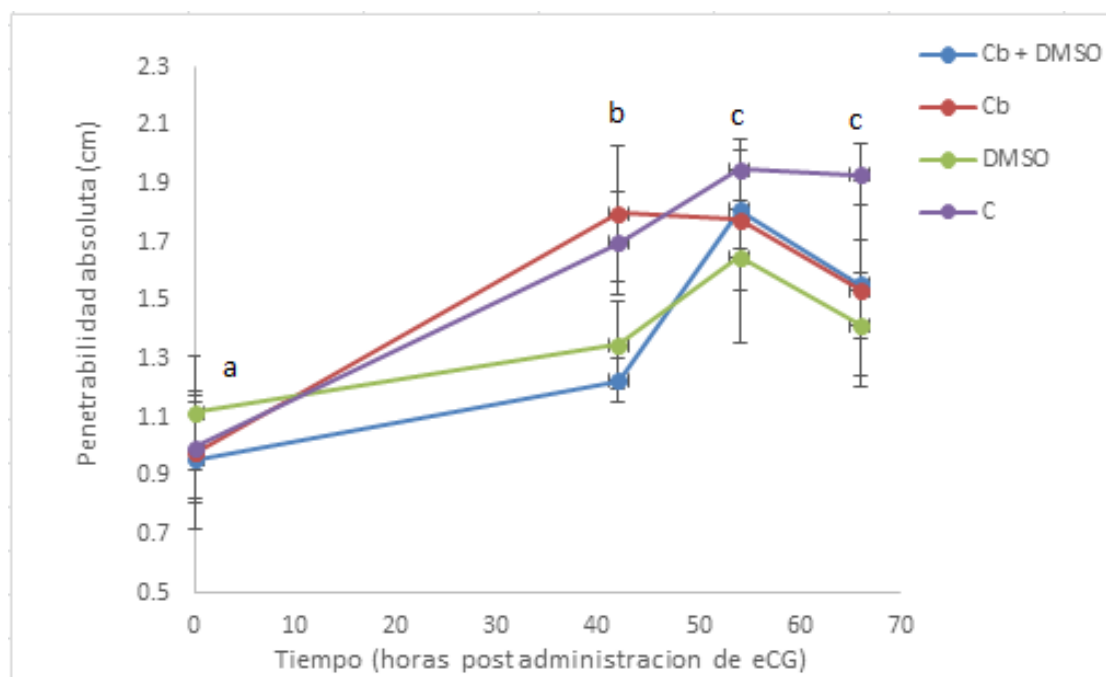


Figura 7. Penetrabilidad cervical absoluta (cm, media \pm sem) a las 0, 42, 54 y 66 h post eCG de ovejas Corriedale tratadas con $100 \mu\text{g}$ (2 mL) de Cb (Decomotón, Laboratorios Callier, Uruguay; grupos Cb y Cb+DMSO, $n=5$ y $n=7$, respectivamente) y/o DMSO 2 % (1 mL) en glicerina en forma tópico intra vaginal (Carlo Erba, N° lote P1C024121D; grupos DMSO y Cb+DMSO, $n=6$ y $n=7$, respectivamente) y suero fisiológico i/m (2 mL) y glicerina intravaginal (1 mL) (grupo Control, C, $n=6$), 12 h antes del momento esperado de la inseminación artificial a tiempo fijo (42 h post eCG) luego de la sincronización de la ovulación con esponjas impregnadas en MAP y eCG i/m. Diferentes letras indican diferencias significativas entre h post eCG con una $p < 0,0001$.

La penetrabilidad cervical absoluta aumentó de las 0 h post eCG a las 42 h post eCG en todos los grupos y volvió a aumentar a las 54 h post eCG, sin diferencias en ésta última respecto a la penetrabilidad registrada a las 66 h post eCG (1,01; 1,52; 1,80 y $1,62 \pm 0,09$ cm, respectivamente, mean \pm pooled sem, $P < 0,0001$)).

La penetrabilidad cervical absoluta fue menor en los grupos tratados con DMSO respecto a los no tratados con DMSO ($1,38 \pm 0,06$ cm y $1,59 \pm 0,07$ cm, respectivamente, mean \pm sem, $P < 0,03$)).

Penetrabilidad cervical relativa

La penetrabilidad cervical relativa (cm) también fue afectada por la hora post eCG ($P < 0,0001$) y el tratamiento con DMSO ($P < 0,01$) (Figura 8).

Al igual que la penetrabilidad cervical absoluta, la penetrabilidad cervical relativa también fue menor a las 0 h post eCG que a las 42 h post eCG y a las 42 h post eCG respecto a las 54 h post eCG, aunque globalmente tendió a ser mayor a las 54 h post eCG respecto a las 66 h post eCG ($0,00$; $0,51$; $0,79$ y $0,57 \pm 0,09$ cm, respectivamente ($P = 0,0898$), $\text{mean} \pm \text{pooled sem}$).

La penetrabilidad cervical relativa también fue menor en los grupos tratados con DMSO respecto a los no tratados ($0,35 \pm 0,06$ cm y $0,56 \pm 0,07$ cm, respectivamente, $P < 0,01$)).

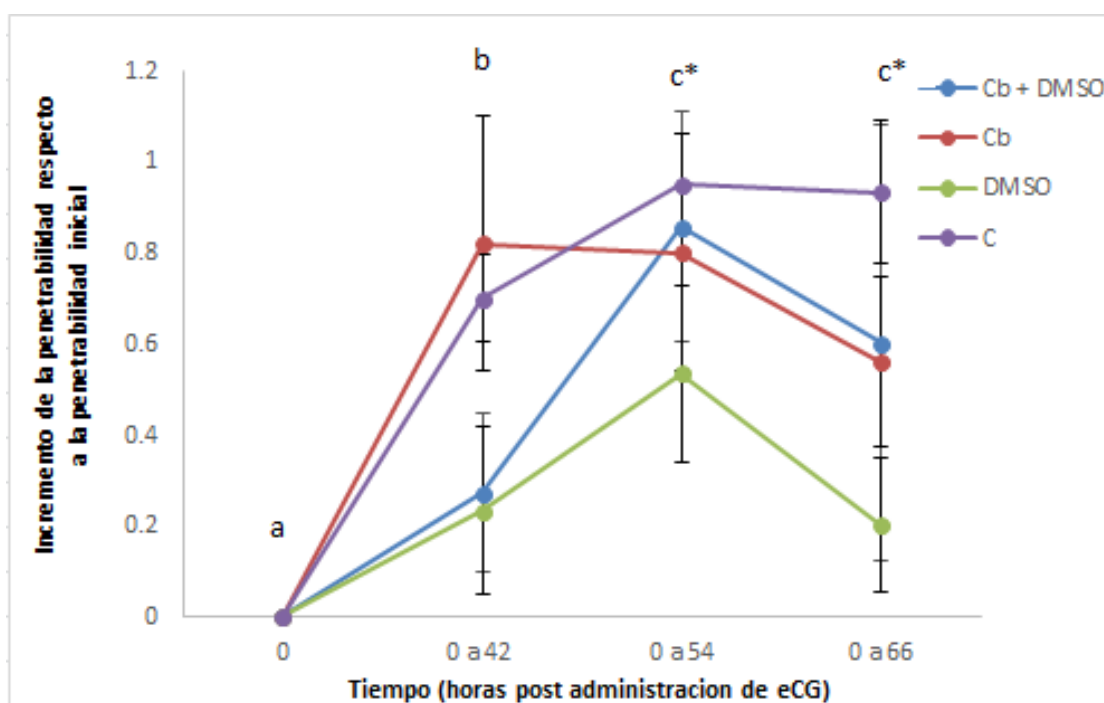


Figura 8. Penetrabilidad cervical relativa (diferencia entre la penetrabilidad a las 42 h, 54 h y 66 h post eCG y la penetrabilidad inicial a las 0 h post eCG) (cm) de ovejas Corriedale tratadas con $100 \mu\text{g}$ (2 mL) de Cb (Decomotón, Laboratorios Callier, Uruguay; grupos Cb y Cb+DMSO, $n=5$ y $n=7$, respectivamente) y DMSO 2 % (1 mL) en glicerina en forma tópica intra vaginal (Carlo Erba, N° lote P1C024121D; grupos DMSO y Cb+DMSO, $n=6$ y $n=7$, respectivamente) y suero fisiológico i/m (2 mL) y glicerina intravaginal (1 mL) (grupo Control, C, $n=6$), 12 h antes del momento esperado de la inseminación artificial a tiempo fijo luego de la sincronización de la ovulación con esponjas impregnadas en MAP y eCG i/m (42 h post eCG). Diferentes letras indican diferencias significativas entre h post eCG con una $p < 0,0001$. El asterisco indica una tendencia a ser diferentes entre h post eCG con una $P = 0,0898$.

Incremento de la penetrabilidad cervical

Antes del tratamiento (0 a 42 post eCG), el incremento de la penetrabilidad (cm) fue afectado por el agrupamiento ($P < 0,02$) (Figura 9). El incremento de penetrabilidad fue menor en los grupos que fueron tratados con DMSO respecto a los que no fueron tratados con DMSO ($0,25 \pm 0,13$ cm y $0,76 \pm 0,14$ cm, respectivamente, $P < 0,05$)).

Las primeras 12 h luego del tratamiento (42 a 54 h post eCG), el incremento de la Penetrabilidad fue afectado por el DMSO ($P < 0,05$) y por la interacción entre Cb y DMSO ($P < 0,02$) (Figura 9). Los grupos tratados con DMSO mostraron un mayor Incremento de la Penetrabilidad respecto a los que no fueron tratados con DMSO ($0,44 \pm 0,11$ cm y $0,12 \pm 0,11$ cm, respectivamente, $P < 0,05$)) y el grupo tratado con Cb y DMSO tuvo mayor incremento de la Penetrabilidad que el grupo tratado solo con Cb ($0,59 \pm 0,15$ cm y $0,0 \pm 0,17$ cm, respectivamente, $P < 0,02$).

Luego del momento esperado de la IATF y hasta 12 h después (54 a 66 h post eCG), el Incremento de la Penetrabilidad fue negativo en todos los grupos y no fue afectado por el tratamiento con Cb, ni con DMSO y tampoco hubo interacción entre ellos (Figura 9).

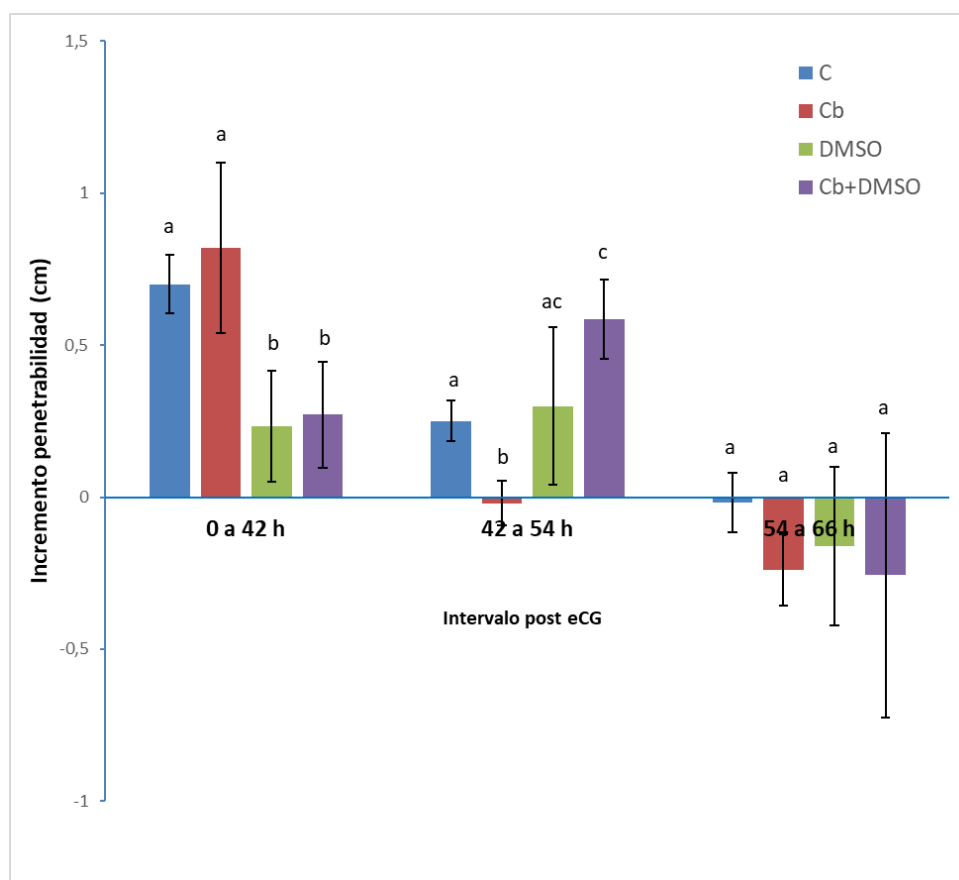


Figura 9. Incremento de la Penetrabilidad cervical (diferencia entre la penetrabilidad en los intervalos 0 a 42 h, 42 a 54 y 54 a 66 h post eCG), (cm) de ovejas Corriedale tratadas con 100 µg (2 mL) de Cb (Decomotón, Laboratorios Callier, Uruguay; grupos Cb y Cb+DMSO, n=5 y n=7, respectivamente) y/o DMSO 2 % (1 mL) en glicerina en forma tópico intra vaginal (Carlo Erba, N° lote P1C024121D; grupos DMSO y Cb+DMSO, n=6 y n=7, respectivamente) y suero fisiológico i/m (2 mL) y glicerina intravaginal (1 mL) (grupo Control, C, n=6), 12 h antes del momento esperado de la inseminación artificial a tiempo fijo luego de la sincronización de la ovulación con esponjas impregnadas en MAP y eCG i/m (42 h post eCG). Diferentes letras indican diferencia significativas entre grupos para un mismo intervalo con una $p < 0,05$.

6. DISCUSIÓN

En éste trabajo se demuestra que la administración tópica de DMSO al 2% 12 h antes del momento esperado de la IATF, aumenta la penetrabilidad cervical en ovejas.

Si bien la administración tópica del DMSO no produjo efectos visibles sobre la integridad de la mucosa vaginal y la del orificio cervical externo y sus pliegues, se registró acumulación de líquidos en el fórnix vaginal, que entorpeció la canulación cervical al momento esperado de la IATF. El acúmulo de un volumen mayor de líquidos al que fue administrado en forma tópica, sugiere la extravasación de líquidos de los tejidos hacia la luz vaginal, pudiendo ser consecuencia de la actividad higroscópica de la glicerina (Damián, 2015) utilizada como vehículo del DMSO y/o del propio DMSO (Da Silva Pires, 2019). En éste sentido, se podría especular que la absorción del principio activo por parte de la mucosa cervical pudo haber estado comprometido. Para próximos experimentos, se sugiere utilizar un solvente acuoso, inocuo y absorbible, para facilitar la incorporación del principio activo al tejido y evitar la acumulación de líquidos.

Tanto la Penetrabilidad cervical absoluta como la relativa mostraron un incremento entre las 0 y las 54 h post eCG y una estabilización hasta las 66 h post eCG (Figura 7). Considerando el intervalo entre el tratamiento para sincronizar la ovulación y el tratamiento para inducir la dilatación cervical (0 a 42 h post eCG), se registró un aumento en las tres formas de expresar la Penetrabilidad cervical en todos los animales. Se ha propuesto que el aumento en la Penetrabilidad cervical luego de la inducción de la ovulación con gonadotrofinas es producto del aumento en la concentración de E2 sintetizados por la onda folicular ovulatoria inducida, lo que fue reportado previamente en ovejas sincronizadas (Kershaw et al 2005; Falchi et al 2012; Leethongdee et al 2007), pero también en la fase folicular de ovejas ciclando naturalmente (Halbert et al 1990 b; Casuriaga, 2019). El ambiente estrogénico

durante la fase folicular, produciría la activación del sistema parácrino Ox/PGE2, el aumento de la actividad de las hialuronato sintasas y de las colagenasas de la matriz extracelular del tejido cervical, lo que produciría la desagregación y degradación, respectivamente, del colágeno cervical, facilitando la apertura del canal (Leethongdee, Kershaw-Young, Scaramuzzi y Khalid, 2010; Rodríguez Piñón, 2015).

Sin embargo, el aumento de la Penetrabilidad cervical entre las 0 y las 42 h post eCG fue distinto entre los grupos de tratamientos de inducción a la dilatación cervical, a pesar de que aún no lo habían recibido y de que todos los animales habían recibido el mismo tratamiento de sincronización de la ovulación. Efectivamente, los animales destinados a ser tratados con DMSO tuvieron un Incremento de la Penetrabilidad cervical menor que los destinados a no ser tratados con DMSO (Figura 9). No tenemos una explicación al respecto, más allá de la gran variabilidad individual del registro de la Penetrabilidad cervical (Rodríguez Piñón, 2015). El hecho de que, entre las 0 y las 42 h post eCG, los animales destinados a ser tratados con DMSO tuvieron un Incremento de la Penetrabilidad cervical menor que los destinados a no ser tratados con DMSO, determinó que en el análisis global (considerando todos los intervalos del experimento) los grupos que fueron tratados con DMSO mostraron valores menores de Penetrabilidad cervical absoluta y de Penetrabilidad cervical relativa respecto a los grupos no tratados con DMSO. Para próximos experimentos, se sugiere homogenizar los grupos de tratamientos experimentales considerando el Incremento de la Penetrabilidad entre el momento de sincronización de la ovulación y el momento del tratamiento de inducción a la dilatación cervical.

En el intervalo de tratamiento, entre las 42 y las 54 h post eCG, los grupos tratados con DMSO mostraron mayor Incremento de la Penetrabilidad cervical respecto a los grupos no tratados con DMSO (Figura 9). Esto coincide con los experimentos previos *in vitro*, de los cuales la administración de DMSO al 2% durante 12 h a explantes cervicales de ovejas en fase folicular, aumentó la actividad tanto de las formas latente y activadas de la colagenasa MMP-2 (De Cuba y Paiva, 2021). En este experimento, se concluyó que el DMSO facilitó la salida de ambas formas de la enzima desde el citosol celular hacia la MEC, debido a su efecto sobre el aumento en la permeabilidad de la membrana celular. Sin embargo, el tratamiento con Cb sola no tuvo efecto sobre la Penetrabilidad cervical e incluso el Incremento de la Penetrabilidad cervical en éste período fue menor a los controles. Esto no coincidió con el experimento previo realizado *in vivo*, en el cual la Cb sola aumentó la Penetrabilidad cervical absoluta (Casuriaga, 2019). No tenemos una explicación evidente para ésta contradicción, aunque el hecho de que el número de animales en éste grupo haya sido el más reducido podría estar influyendo en que el efecto de la Cb no haya sido evidente. Dado que la asociación Cb y DMSO mostró un Incremento de la Penetrabilidad mayor al grupo tratado solo con Cb, pero no mayor al grupo tratado solo con DMSO, sugiere que la asociación Cb y DMSO no tuvo un efecto sinérgico. En experimentos previos, el tratamiento con Cb por 12 h a explantes cervicales ovinos aumentó la relación activada/latente de la MMP-2

(Rodríguez Piñón y García Barcelo, 2019), lo que podría indicar que el efecto de la Cb se ejerce fundamentalmente sobre la activación de la MMP-2, que se realiza por proteólisis limitada a cargo de proteasas existentes en la matriz extracelular (Hulboy et al., 1997). Se podría especular que, en nuestro experimento, si bien el DMSO pudo haber producido una migración de la forma latente de la MMP-2 hacia la matriz extracelular, la Cb no fue eficaz en su activación. Experimentos in vitro con determinación de la actividad de ésta enzima serán necesarios para corroborar esto.

En el intervalo post tratamientos de inducción a la dilatación cervical (54 a 56 h post eCG), el incremento de la Penetrabilidad fue negativo en todos los grupos y sin diferencia entre ellos (Figura 9), lo cual produjo que la penetrabilidad cervical relativa tienda a disminuir en la última medición, cuando se analiza globalmente (Figura 8). Esto podría estar sugiriendo que el efecto del tratamiento con DMSO sobre penetrabilidad cervical no se prolonga más allá de las 12 h y que disminuiría al igual que en los animales no tratados con DMSO, sin efectos indeseados como podría ser el mantenimiento de cierta permeabilidad celular que exponga el ambiente cérvico/uterino a patógenos externos o posibles interacciones con el transporte espermático.

7. CONCLUSIÓN

En suma, en éste trabajo se obtuvieron evidencias de que la administración tópica de DMSO al 2% 12 h antes del momento esperado de la IATF en ovinos, aumenta la penetrabilidad cervical. No se obtuvieron evidencias de que la Cb im administrada 12 h antes del momento esperado de la IATF aumente la penetrabilidad cervical. No podemos descartar que haya un efecto sinérgico entre ambos.

El máximo aumento de la penetrabilidad cervical obtenido en los animales tratados con DMSO fue 3 mm superior a los animales no tratados con DMSO, lo que pone en duda un potencial efecto positivo de la utilización del DMSO sobre la eficiencia de la IA.

El efecto del DMSO sobre el incremento en la penetrabilidad cervical no se prolonga más allá de 12 h luego de su administración.

Hace falta más investigación para sugerir al DMSO como alternativa terapéutica para incrementar la penetrabilidad cervical.

8. BIBLIOGRAFIA

- Álvarez, M., Chamorro, C. A., Kaabi, M., Anel-Lopez, L., Boixo, J. C., Anel, E., y De Paz, P. (2012). Design and “in vivo” evaluation of two adapted catheters for intrauterine transcervical insemination in sheep. *Animal Reproduction Science*, 131: 153–159.
- Atke, A., y Vilhardt, H. (1987). Uterotonic activity and myometrial receptor affinity of 1-deamino-1-carba-2-tyrosine(O-methyl)-oxytocin. *Acta Endocrinologica (Copenh)* 115: 155-160.
- Bartlewski, P. M., y Candappa, I. B. R. (2015). Assessing the usefulness of prostaglandin E2 (Cervidil) for transcervical artificial insemination in ewes. *Theriogenology*, 84: 1594–1602.
- Buckrell, B. (2000). *Reproductive Technologies Proceedings of the 6th Great Lakes Dairy Sheep Symposium*, Guelph, Ontario, Canada. November 2000. pag. 77-93.
- Buckrell, B. C., Buschbeck, C., Gartley, C. J., Kroetsch, T., McCutcheon, W., Martin, J., y Walton, J. S. (1994). Further development of a transcervical technique for artificial insemination in sheep using previously frozen semen. *Theriogenology*, 42: 601–611.
- Campbell, J. W., Harvey, T. G., McDonald, M. F., y Sparksman, R. I. (1996). Transcervical insemination in sheep: an anatomical and histological evaluation. *Theriogenology*, 45: 1535–1544.
- Candappa, B. R., Bainbridge, H. C., Price, N. T., Hourigan, K. R., y Bartlewski, P. (2009). A preliminary study on the suitability of Cervidil® to induce cervical dilation for artificial insemination in ewes. *Research in Veterinary Science*, 87: 204–206.
- Candappa, B.R., y Bartlewski, P. (2012). A review of advances in artificial insemination (AI) and embryo transfer (ET) in sheep, with the special reference to hormonal induction of cervical dilation and its implications for controlled animal reproduction and surgical techniques. *The Open Reproductive Science Journal*, 3: 162-175.
- Candappa, B.R, y Bartlewski, P. (2014). Induction of cervical dilation for transcervical embryo transfer in ewes. *Reproductive Biology Endocrinology*, 12: 1-9.
- 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.
- Damián Bautista, C. L. (2015). *Catalizadores básicos para la esterificación de la glicerina*. Instituto Politécnico Nacional: México D.F.
- Da Silva Pires, J. (2019). *Efeitos farmacológicos da administração do dimetil sulfóxido em equinos (equus caballus)*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Brasil.

- De Cuba, A., y Paiva, A. (2021). *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* (Tesis de Grado). Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo.
- De Rossi, R., Carneiro, R.P.B., Ossuna, M.R., Zanenga, N.F., Alves, O.D, Jorge, T.P., Costa-eSilva, E.V., y 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.
- Sistema Nacional de Información Ganadera (2022) *Declaración Jurada Anual de Existencias DICOSE-SNIG 2021-2022*. Recuperado de <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/datos-y-estadisticas/datos/datos-preliminares-basados-declaracion-jurada-existencias-dicose-snig-2022>
- El Maradny, E., Kanayama, N., Kobayashi, H., Hossain, B., Khatun, S., Liping, S., ... Terao, T. (1997). The role of hyaluronic acid as a mediator and regulator of cervical ripening. *Human Reproduction*, 12(5), 1080-1088.
- Eppleston, J., Salamon, S., Moore, N.H., y 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.
- Fabián, M., Forsling, M., y Jones, J. (1969). The clearance and antidiuretic potency of neurohypophysal hormones in man, and their plasma binding and stability. *Journal of Physiology*, 204:653–8.
- Falchi, L., Taema, M., La Clanche, S., y 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: (2012) 376–384.
- Fierro, S., Olivera, J., Gil, J., Durán, J., y Durán, G. (2009). *Preguntas y respuestas sobre la IATF en ovinos asociada a inseminación intrauterina y a la refrigeración de semen*. Disponible en http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_ovina/inseminacion_ovinos/26-IATF_ovinos.pdf
- Fonseca, J. F., Souza-Fabjan, J. M. G., Oliveira, M. E. F., Leite, C. R., Nascimento-Penido, P. M. P., Brandão, F. Z., y Lehloenya, K. C. (2016). Nonsurgical embryo recovery and transfer in sheep and goats. *Theriogenology*, 86:144–151.
- Fonseca, J. F., Zambrini, F. N., Alvim, G. P., Peixoto, M. G. C. D., Verneque, R. S., y Viana, J. H. M. (2013). Embryo production and recovery in goats by nonsurgical transcervical technique. *Small Ruminant Research*, 111: 96–99.

- Fuchs, A.R., Graddy, L.G., Kowalski, A.A., Fields, M.J. (2002). Oxytocin induces PGE2 release from bovine cervical mucosa in vivo. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 70: 119-129.
- Secretariado Uruguayo de la Lana (2019). *Producción ovina en Uruguay*. Recuperado de <https://www.sul.org.uy/noticias/416#:~:text=La%20producci%C3%B3n%20ovina%20en%20Uruguay&text=En%202019%20la%20producci%C3%B3n%20ovina,los%2069%20millones%20de%20d%C3%B3lares>
- Fukui, Y., y Roberts, E. M. (1978). Further studies on non-surgical intrauterine technique for artificial insemination in the ewe. *Theriogenology*, 10: 381–393.
- Goodman, R.L. (1994). Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. En *The Physiology of Reproduction*. (2° ed., pp 659-709). Raven Press Ltd.: New York.
- Gorodeski, G.I. (1996). The cervical cycle. En G.I. Gorodeski *Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology*. Philadelphia, pp.301-324.
- Gurtovenko, A., y 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, G. W., Dobson, H., Walton, J. S., Sharpe, P., y Buckrell, B. C. (1990). Field evaluation of a technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. *Theriogenology*, 33: 1231–1243.
- Halbert, G.W., H.Dobson, J.S. Walton, B.C., y Buckrell. 1990. The structure of the cervical canal of de ewe. *Theriogenology*, 33(5), 977-992.
- Heydon R.A., y Adams, N.R. (1979). Comparative morphology and mucus histochemistry of the ruminant cervix: differences between crypt and surface epithelium. *Biology of Reproduction*, 21(3), 557-562.
- Houdeau, E., Raynal, P., Marnet, P.-G., Germain, G., Mormède, P., Rossano, B., y Prud'Homme, M.-J. (2002). Plasma levels of cortisol and oxytocin, and uterine activity after cervical artificial insemination in the ewe. *Reproduction Nutrition Development*, 42, 381–392.
- Hulboy, D.L, Rudolph, L.A, y Matrisian, L.M. (1997). Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Molecular Human Reproduction* 3, 27-45.
- Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (s.f). *Programa Nacional de Investigación Producción de Carne y Lana*. Recuperado de <http://www.inia.org.uy/online/site/315838I1.php>
- Kaabi, M., Alvarez, M., Anel, E., Chamorro, C. A., Boixo, J. C., De Paz, P., y Anel, L. (2006). Influence of breed and age on morphometry and depth of inseminating catheter penetration in the ewe cervix: a postmortem study. *Theriogenology*, 66, 1876–1883.

- Kershaw, C.M., Khalid, M., McGowan, M.R., Ingram, K., Leethongdee, S., Wax, G., y Scaramuzzi, R.J. (2005). The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology*, 64, 1225-1235.
- Khalifa, R. M., Sayre, B. L., y Lewis, G. S. (1992). Exogenous oxytocin dilates the cervix in ewes. *Journal of Animal Science*, 70: 38–42.
- King, M.E., McKelvey, W.A., Dingwall, W.S., Matthews, K.P., Gebbie, F.E., Mylne, M.J., ... Robinson, J.J. (2004). Lambing rates and litter sizes following intrauterine or cervical insemination of frozen/thawed semen with or without oxytocin administration. *Theriogenology*, 62, 1236-1244.
- Leethongdee, S., Kershaw-Young, C.M., Scaramuzzi, R.J., y Khalid M. (2010). Intra cervical application of Misoprostol at estrus alters the content of cervical hyaluronan and the mRNA expression of follicle stimulating hormone receptor (FSHR), luteinizing hormone receptor (LHR) and cyclooxygenase-2 in the ewe. *Theriogenology*, 73, 1257-1266.
- Leethongdee, S., Khalid, M., Bhatti, A., Ponglowhapan, S., Kershaw, C. M., y Scaramuzzi, R. J. (2007). The effects of the prostaglandin E analogue Misoprostol and follicle-stimulating hormone on cervical penetrability in ewes during the peri-ovulatory period. *Theriogenology*, 67, 767–777.
- Lightfoot, R.J. (1970). The contractile activity of the genital tract of the ewe in response to oxytocin and mating. *Journal of Reproduction and Fertility*, 21, 376.
- Moré, J. (1984). Anatomy and histology of the cervix uteri of the ewe: new insights. *Acta Anat (Basel)*, 120(3), 156-159.
- Naqvi, S. M. K., Pandey, G. K., Gautam, K. K., Joshi, A., Geethalakshmi, V., y Mittal, J. P. (2005). Evaluation of gross anatomical features of cervix of tropical sheep using cervical silicone moulds. *Animal Reproduction Science*, 85, 337–344.
- Notman R., Noro M., O'Malley B., y Anwar, J. (2006). Molecular Basis for Dimethylsulfoxide (DMSO) Action on Lipid Membranes. *Journal of the American Chemical Society*, 128(43), 13982-13983.
- Olivera-Muzante, J., Fierro, S., López, V., y Gil, J. (2011). Comparison of prostaglandin- and progesterone-based protocols for timed artificial insemination in sheep. *Theriogenology*, 75, 1232-1238.
- Pubchem, National Library of Medicine (s.f.) *Dimethyl Sulfoxide (Compound)* Recuperado de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/dimethylsulfoxide#section=Information-Sources>.

- Rath, W. (2009). Prevention of postpartum haemorrhage with the oxytocin analogue carbetocin. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 147: 15–20.
- Robinson, J.J., McKelvey, W.A., King, M.E., Mitchell, S.E., Mylne, M.J., McEvoy, T.G., ... Williams, L.M. (2011). Traversing the ovine cervix - a challenge for cryopreserved semen and creative science. *Animal*, 5(11), 1791-1804.
- Rocanova, M. (2022). El rubro ovino en Uruguay: tradición, innovación y oportunidades. *Ovinos SUL- La Revista del Secretariado Uruguayo de la Lana*. p 24.
- Rodríguez Piñón, M. (2003). Importancia del cervix ovino como barrera para la Inseminación Artificial. En R. Ungerfeld, *Reproducción de los Animales Domésticos*. (vol. 2, pp. 353-364). MELIBEA: Montevideo.
- 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. (2015). *Estudios endócrinos y moleculares en el Cervix ovino durante el Ciclo Estral y el Anestro Estacional*. Tesis de Doctorado. Facultad de Veterinaria, UdelaR, 66 p.
- Rodríguez Piñón, M., y 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.
- Salamon, S., y Lightfoot, R. (1967). Fertility of ram spermatozoa frozen by the pellet method III. The effects of insemination technique, oxytocin and relaxin on lambing. *Journal of reproduction and fertility*, 22, 409-23.
- Salamon, S, y Maxwell, W. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62, 77-111.
- Sayre, B.L.,y Lewis, G.S. (1996). Cervical dilation with exogenous oxytocin does not affect sperm movement into the oviducts in ewes. *Theriogenology*, 45, 1523-1533.
- Sayre, B.L., y Lewis, G.S. (1997). Fertility and ovum fertilization rate after laparoscopic or transcervical intrauterine artificial insemination of oxytocin-treated ewes. *Theriogenology*, 48, 267-275.
- Stellflug, J.N., Wulster-Radcliffe, M.C., Hensley, EL, Cowardin, E.A, Seals, RC, y Lewis GS. (2001). Oxytocin-induced cervical dilation and cervical manipulation in sheep: effects on laparoscopic artificial insemination. *Journal of Animal Science*, 79: 568-573.
- Stjernholm, Y., Sahlin, L., Akerberg, S., Elinder, A., Eriksson, H.A., Malmstrom, A., y 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.

Sweeney, G., Holbrook, AM., Levine, M., Yip, M., Alfredsson, K., Cappi, S., y Wassenaar, W. (1990). Pharmacokinetics of carbetocin, a longacting oxytocin analogue, in nonpregnant women. *Current Therapeutic Research*, 47, 520–40.

Vilariño,, M. y Menchaca, A. (2007). Inseminación artificial en pequeños rumiantes. Fisiología y manejo reproductivo en pequeños rumiantes. Instituto de Reproducción Animal de Uruguay, Curso de posgrado. *Reproducción en Rumiantes*. (p.41-51). Montevideo. Uruguay.

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

Wulster-Radcliffe, M. C., y Lewis, G. S. (2002). Development of a new transcervical artificial insemination method for sheep: effects of a new transcervical artificial insemination catheter and traversing the cervix on semen quality and fertility. *Theriogenology*, 58, 1361–1371.

Wulster-Radcliffe, M. C., Wang, S., y Lewis, G. S. (2004). Transcervical artificial insemination in sheep: effects of a new transcervical artificial insemination instrument and traversing the cervix on pregnancy and lambing rates. *Theriogenology*, 62, 990–1002.