

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**“DETERMINACIÓN DEL EFECTO IN VITRO DE LA CARBETOCINA (CB) Y/O DEL
DIMETILSULFÓXIDO (DMSO), SOBRE LA ACTIVIDAD DE COLAGENASAS EN
CÉRVIX DE OVEJAS EN FASE FOLICULAR”**

“Por”

EIRAS PEDRAZA, Agustín
SÁEZ VOLA, José Ignacio
THEVENET GERMANO, Cecilia

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

MODALIDAD: Ensayo Experimental

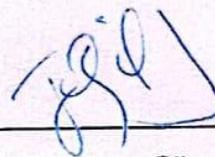
**MONTEVIDEO,
URUGUAY**

2024

PÁGINA DE APROBACIÓN

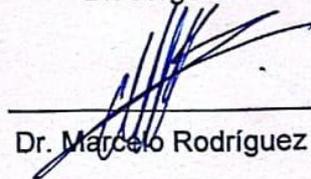
Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:



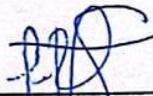
Dr. Jorge Gil

Segundo miembro (tutor):



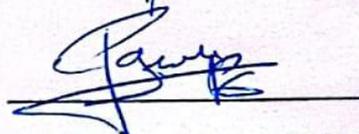
Dr. Marcelo Rodríguez Piñón

Tercer miembro:



Ing. Agr. Livia Pinto.

Cuarto miembro (co-tutor):



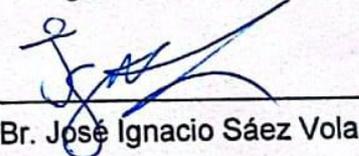
Aux Farm. Gonzalo García Barcelo

Fecha: 28 de mayo de 2024

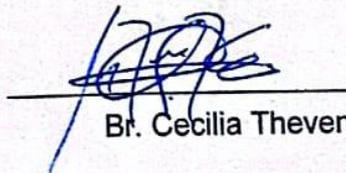
Autores:



Br. Agustín Eiras Pedraza



Br. José Ignacio Sáez Vola



Br. Cecilia Thevenet Germano

AGRADECIMIENTOS

Queremos brindar nuestros más sinceros agradecimientos al Dr. Marcelo Rodríguez Piñón y al Auxiliar de Farmacia Gonzalo García Barcelo por su gran paciencia, confianza, interés y apoyo en todo el camino recorrido. Sin ellos nada de esto sería posible.

También agradecer al personal del laboratorio de Bioquímica de Facultad de Veterinaria por su ayuda en las tareas realizadas y por estar siempre a disposición ante dudas que surgieran.

A la Dra. Ana Inés Aznares del frigorífico Nirea S.A. por proveer los tejidos utilizados en nuestro ensayo.

A la querida Facultad de Veterinaria, que siempre nos recibió con las puertas abiertas y luego de tantos años se convirtió en nuestra segunda casa.

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 DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE FIGURAS	5
RESUMEN	6
SUMMARY	7
1. INTRODUCCIÓN.....	8
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	10
2.1 Producción ovina en el Uruguay	10
2.2 Cérvix como barrera para la inseminación	10
2.3 Inducción de la dilatación cervical en ovinos.....	12
2.4 El Dimetilsulfóxido como posible agente inductor de la dilatación cervical en ovinos.....	15
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS GENERALES Y ESPECIFICOS.....	17
3.1 HIPÓTESIS	17
3.1.1 HIPÓTESIS I:.....	17
3.1.2 HIPÓTESIS II:.....	17
3.2 OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS.....	17
3.2.1 Objetivo general.....	17
3.2.2 Objetivos Específicos	17
4. MATERIALES Y MÉTODOS	17
4.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	19
5. RESULTADOS	19
6. DISCUSIÓN	24
7. CONCLUSIONES.....	28
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Evolución del Stock ovino en los últimos 10 años.	10
Figura 2. Clasificación morfológica del cérvix de ovejas adultas según el grado de complejidad estructural y su relación con la profundidad de penetración cervical.....	11
Figura 3. Molde de silicona del canal cervical de la oveja adulta. Naqvi et al., 2005.	12
Figura 4. Estructura química de un dimetilsulfóxido (DMSO).....	15
Figura 5. Distintos modos de acción de DMSO sobre membranas de fosfolípidos.....	16
Figura 6. Zimografía de SDS PAGE co-polimerizado con gelatina, para la detección de la actividad MMP-2 y MMP-9 en cérvix ovino.....	19
Figura 7. Actividad de la forma Latente (L) de la MMP-2 (ng/mg tejido), en el sobrenadante de explantes de cérvix craneal y caudal de ovejas en fase folicular (n=8).....	20
Figura 8. Actividad de la forma Latente (L) de la MMP-2 (ng/mg tejido) en el sobrenadante de explantes de cérvix de ovejas en fase folicular (n=8) incubados por 12 h en medio MEM con DMSO en concentraciones crecientes (0, 0.25, 0.5, 1 y 2%).....	20
Figura 9. Actividad de la forma Latente (L) de la MMP-2 (ng/mg tejido) en el sobrenadante de explantes de cérvix craneal y caudal de ovejas en fase folicular (n=8) incubados por 12 h en medio MEM con DMSO en concentraciones crecientes (0, 0.25, 0.5, 1 y 2%).....	21
Figura 10. Actividad de la forma Latente (L) de la MMP-2 (ng/mg tejido) en el sobrenadante de explantes de cérvix de ovejas en fase folicular (n=8) incubados por 12 h en medio MEM en presencia o no de Cb (100 ng/mL).	22
Figura 11. Actividad de la forma Latente (L) de la MMP-2 (ng/mg tejido) en el sobrenadante de explantes de cérvix craneal y caudal de ovejas en fase folicular (n=8) incubados por 12 h en medio MEM en presencia o no de Cb (100 ng/mL).22	
Figura 12. Actividad de la forma Latente (L) de la MMP-2 (ng/mg tejido) en el sobrenadante de explantes de cérvix craneal y caudal de ovejas en fase folicular (n=8) incubados por 12 h en medio MEM con DMSO en concentraciones crecientes (0, 0.25, 0.5, 1 y 2%) en presencia o no de Cb (100 ng/mL).....	23
Figura 13. Relación entre la actividad de las formas activada (A) y latente (L) de la MMP-2, en el sobrenadante de explantes de cérvix craneal y caudal de ovejas en fase folicular (n=8).....	24

RESUMEN

La inseminación artificial transcervical en la especie ovina está limitada por la estrechez del cérvix. En la dilatación cervical participan enzimas que degradan la matriz extracelular (Metaloproteinasas de la Matriz extracelular o MMPs), en especial las MMP-2 y MMP-9. La actividad de las mismas es dependiente de hormonas (Estrógenos, Oxitocina) y factores inflamatorios (Prostaglandinas, Estrógenos, Radicales libres), entre otros. Experimentos previos in vivo e in vitro mostraron evidencias de que la Carbetocina (Cb, análogo sintético de la Oxitocina) y el Dimetilsulfóxido (DMSO) podrían actuar en forma aditiva/sinérgica sobre la actividad de la MMP-2. En esta Tesis se propone estudiar el efecto de dosis crecientes de DMSO (0, 0.25, 0.5, 1.0 y 2.0 %) en presencia o no de Cb (100 ng/ml) sobre la actividad enzimática de las formas Activada (A) y Latente (L) de las MMP-2 y 9 en cérvix ovino, determinada mediante zimografía en gelatina SDS-PAGE. La actividad de las formas A y L y la relación A/L de MMP fueron analizadas mediante test no paramétricos. Los datos fueron analizados mediante el test de Wilcoxon para muestras pareadas para detectar los efectos de la zona cervical (cranial y caudal) y para el efecto de la Cb (con o sin Cb) y mediante el Test de Friedman con un test posterior de Dunn's para muestras pareadas, para detectar el efecto de las diferentes dosis de DMSO utilizadas; Para el caso de las interacciones se utilizó el programa GraphPad Prism 10. La actividad de la forma A y L de la MMP-9 fue escasa y esporádica, en un 19,4% de las muestras analizadas. En cambio, la actividad de la forma L de la MMP-2 fue afectada tanto por la zona cervical, la dosis de DMSO, la presencia de Cb y por las interacciones entre ellos. Se destaca que la actividad de L MMP-2 fue mayor con las dosis de DMSO de 0.5 a 2%, respecto al control no tratado y en presencia de Cb. La actividad de la forma A fue afectada solo por el tratamiento con DMSO, siendo mayor respecto al control no tratado a dosis de 1%. La relación entre las formas A y L de la MMP-2 (Rel A/L) fue afectada por la zona cervical y por el tratamiento con DMSO, destacándose que la Rel A/L de la MMP-2 fue menor en el tratamiento con DMSO 1% respecto al control no tratado. En conclusión, los resultados permiten consolidar el concepto de que la actividad de la MMP-2 predomina respecto a la de la MMP-9 en las modificaciones de la matriz extracelular cervical en ovejas en fase folicular y aportan evidencias para investigar el potencial uso del DMSO y su asociación con Cb como agente farmacológico para facilitar la penetrabilidad cervical al momento de la IA en ovinos.

SUMMARY

Transcervical artificial insemination in sheep is limited by the narrowness of the cervix. Cervical dilation involves enzymes that degrade the extracellular matrix (Extracellular Matrix Metalloproteinases or MMPs), especially MMP-2 and MMP-9. Their activity is dependent on hormones (Estrogens, Oxytocin) and inflammatory factors (Prostaglandins, Estrogens, Free Radicals), among others. Previous *in vivo* and *in vitro* experiments showed evidence that Carbetocin (Cb, synthetic analogue of Oxytocin) and Dimethyl Sulfoxide (DMSO) could act in an additive/synergistic manner on the activity of MMP-2. In this thesis we propose to study the effect of increasing doses of DMSO (0, 0.25, 0.5, 1.0 and 2.0 %) in the presence or not of Cb (100 ng/ml) on the enzymatic activity of the Activated (A) and Latent (L) forms of MMP-2 and 9 in sheep cervix, determined by SDS-PAGE gelatin zymography. The activity of the A and L forms and the A/L ratio of MMP were analyzed by nonparametric tests. The data were analyzed by the Wilcoxon test for paired samples to detect the effects of the cervical zone (cranial and caudal) and for the effect of Cb (with or without Cb) and by the Friedman test with a subsequent Dunn's test for paired samples, to detect the effect of the different doses of DMSO used; In the case of interactions, the GraphPad Prism 10 program was used. The activity of the A and L forms of MMP-9 was scarce and sporadic, in 19.4% of the samples analyzed. On the other hand, the activity of the L form of MMP-2 was affected by the cervical area, the DMSO dose, the presence of Cb and by the interactions between them. It is noted that the activity of L MMP-2 was higher with DMSO doses of 0.5 to 2%, compared to the untreated control and in the presence of Cb. The activity of the A form was affected only by treatment with DMSO, being higher compared to the untreated control at a dose of 1%. The relationship between the A and L forms of MMP-2 (Rel A/L) was affected by the cervical area and by treatment with DMSO, highlighting that the Rel A/L of MMP-2 was lower in the treatment with 1% DMSO compared to the untreated control. In conclusion, the results allow to consolidate the concept that the activity of MMP-2 predominates over that of MMP-9 in the modifications of the cervical extracellular matrix in sheep in the follicular phase and provide evidence to investigate the potential use of DMSO and its association with Cb as a pharmacological agent to facilitate cervical penetrability at the time of AI in sheep.

1. INTRODUCCIÓN

La producción ovina es un rubro importante para nuestro país, con un stock actual de 5,8 millones de cabezas de ovinos (Datos preliminares DICOSE-MGAP, 2023), distribuidas entre aproximadamente 17.000 productores (Rocanova, 2022) que ocupan un área de 10,6 millones de hectáreas (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca [MGAP], 2011) Casi el 70% de la majada ovina se encuentra concentrada en 7 departamentos al centro y norte del país (Salto, Artigas, Paysandú, Tacuarembó, Durazno, Cerro Largo y Lavalleja) según datos del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP, 2020) Cabe destacar que la población ovina se mantuvo muy por encima de la población bovina y llegó a más que triplicarla al inicio de la década del 90, pero que con el devenir de los años la situación cambió hasta llegar a los 6 millones declarados en el año 2019 (Secretariado Uruguayo de la Lana [SUL]). Para lograr un aumento de stock en poco tiempo y, a su vez, dirigir el potencial genético según la demanda del mercado, la inseminación artificial (IA) pasa a ser una de las herramientas reproductivas claves (Salomon & Maxwell, 2000).

La situación a la cual nos enfrentamos con la IA en ovinos es que posee dos grandes limitantes. Una de ellas es la baja fertilidad que presenta el semen de carnero congelado-descongelado (Salamon y Maxwell, 2000). La otra limitante es la propia anatomía del cérvix ovino. Este es pequeño, estrecho y posee anillos que restringen la luz, determinando cierta complejidad en el canal cervical (Campbell et al., 1996; Halbert et al., 1990; Kershaw et al., 2005; Moré 1984), que constituye una barrera fisiológica contra gérmenes patógenos que atentarían contra la concepción y la salud reproductiva. Así mismo, impide el paso transcervical de la pipeta de inseminación, por lo cual la inseminación intrauterina no sería favorable para esta especie en condiciones fisiológicas normales (Halbert et al., 1990; Kershaw et al., 2005; Salamon & Maxwell 2000).

Se ha registrado que existe una relación positiva entre el sitio de deposición del semen en el canal cervical de la oveja y la tasa de fertilidad lograda, pudiendo llegar a aumentos del 13% de fertilidad por cm de profundidad en la canulación transcervical al usar semen congelado/descongelado (Eppleston, J., Salamon, S., Moore, N.H., & Evans, G. (1994). En otro estudio se ha reportado que durante el estro ocurre cierto grado de dilatación natural del cérvix, el que sería promovido por la relación estrógenos (E)/progesterona circulante (Halbert et al., 1990). El momento de máxima penetración cervical en el período preovulatorio coincide con altas concentraciones de estradiol (Falchi et al., 2012), el cual aumenta la sensibilidad del cérvix a la Oxitocina (Ox), mediante aumento de sus receptores (Matthews & Ajad, 1994; Rodríguez-Piñón et al., 2018). A su vez, la Ox produce la liberación de prostaglandina E2 (PGE2) al mucus cervical en la vaca, actuando como inductor de la dilatación cervical (Fuchs et al., 2002). Se ha sugerido que este entorno hormonal podría ser responsable de la relajación del cuello uterino mediante cambios cualitativos y cuantitativos en la composición de la matriz extracelular cervical, desagregando y degradando activamente el

colágeno, lo que produciría la dilatación del cérvix (Falchi et al., 2012; Rodríguez Piñón, 2015).

La desagregación de las fibras de colágeno está vinculada a un aumento en el contenido de hialuronato en el tejido cervical, inducido por la PGE2 en forma autócrina/parácrina por la mucosa cervical (Kershaw et al., 2007; Rodríguez Piñón et al., 2014). Por otro lado, este mecanismo de desagregación de las fibras de colágeno se acompañaría de la degradación de las mismas, mediante un aumento de la actividad colagenasa, en particular de las llamadas metaloproteinasas, ubicadas en la matriz extracelular (Metaloproteinasas de la Matriz Extracelular o MMP) (Hulboy et al., 1997). Durante la fase folicular de la oveja, se ha reportado un aumento de la actividad cervical de la MMP-2 o colagenasa Tipo IV, pero no de la MMP-9 (Rodríguez-Piñón et al., 2015, 2018). En conjunto, las evidencias indican que ocurre cierto grado de dilatación natural del cérvix de la oveja al momento del estro sería promovido por un aumento en la concentración circulante de los E, que induciría la activación del sistema parácrino Ox/PGE2, lo cual produciría cambios cuali y cuantitativos en la composición del conjuntivo cervical, desagregando y degradando activamente el colágeno, lo que produciría su dilatación. Tratamientos con Ox o PGE2 han sido utilizados para dilatar el cérvix y facilitar su canulación (King et al., 2004; Leethongdee et al., 2010; Owiny & Fitzpatrick 1990; Sayre & Lewis, 1996 y 1997; Stellflug et al., 2001). La Ox natural posee una vida media extremadamente corta (15-30 minutos), como alternativa se cuenta hoy en día con un análogo sintético, la carbetocina (Cb) (Carbetocina Decomotón; Laboratorios Calier, Uruguay), con una acción biológica que se prolonga por 12 horas (Bajcsy et al.; 2006) y que 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).

Según trabajo realizado por Rodríguez-Piñón y García-Barcelo en el año 2019, se demostró que la Cb administrada 12 h antes del momento esperado de la IA (54 h post eCG), aumentó aproximadamente 1 cm la penetrabilidad cervical respecto a los animales no tratados (1.5 vs. 0.6 cm, respectivamente, $P < 0.05$). Este aumento de la penetrabilidad cervical estuvo asociado a la activación de la MMP-2 y una disminución del colágeno cervical. Además, mediante estudios in vitro, la incubación de explantes cervicales por 12 h con Cb y PGE2 produjo la activación de la MMP-2 y un aumento de la relación latente/activada de la MMP-2 dependiente de la dosis de Cb (Paiva & De Cuba, 2020).

Por otro lado, en el laboratorio de Bioquímica de Facultad de Veterinaria se realizó un ensayo experimental In vitro (Paiva & De Cuba, 2020) donde se probó DMSO al 2%, sobre la actividad de las formas latente y activa de la MMPs en explantes de cérvix craneal y caudal ovino. En este ensayo se pudo apreciar que el DMSO podía llegar a tener un efecto como inductor de la dilatación del cérvix en ovinos.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Producción ovina en el Uruguay

La producción ovina es un rubro importante, aunque el stock total del ganado ovino ha disminuido de unos 24 millones y medio de cabezas en los años 90, a 5.851.177 millones declarados en 2023 (datos preliminares declaración jurada DICOSE - MGAP, 2023).

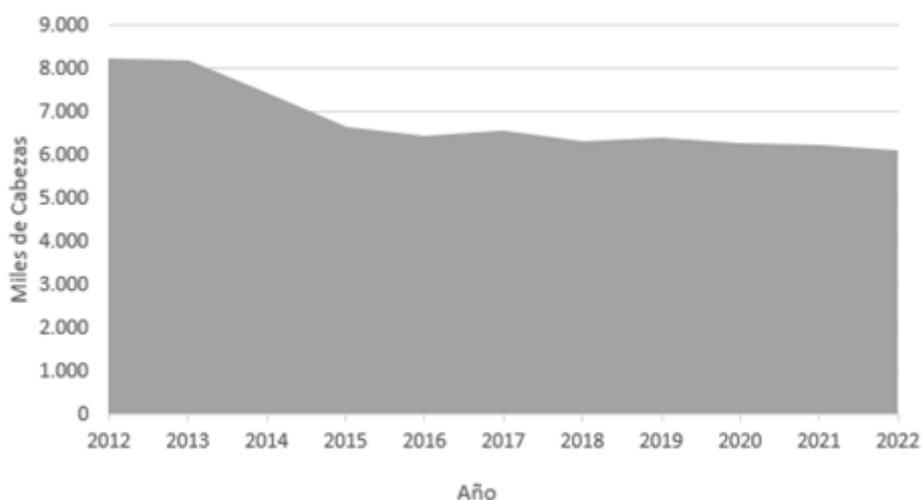


Figura 1. Evolución del stock ovino en Uruguay en el período 2012-2022 (Fuente: DICOSE-Sistema Nacional de Identificación Ganadera (SNIG)).

2.2 Cérvix como barrera para la inseminación

El cérvix de la oveja es un órgano tubular y fibroso, de 5 a 10 cm de largo dependiendo de la raza, compuesto principalmente de tejido conectivo con predominio de colágeno y músculo liso, con una capa serosa exterior y el epitelio luminal interior (More, 1984). Su morfología interna se caracteriza por sus seis pliegues internos desalineados con respecto al primer pliegue. Estos parecen conos truncados que están directamente dirigidos hacia la vagina (Rodríguez Gavancho et al., 2015). Hacia la luz, los pliegues de la mucosa forman 5 a 7 anillos excéntricos en forma de embudo con el vértice hacia caudal, que ocluyen la luz del canal cervical (Halbert et al., 1990; Kershaw et al., 2005; Naqvi et al., 2005).

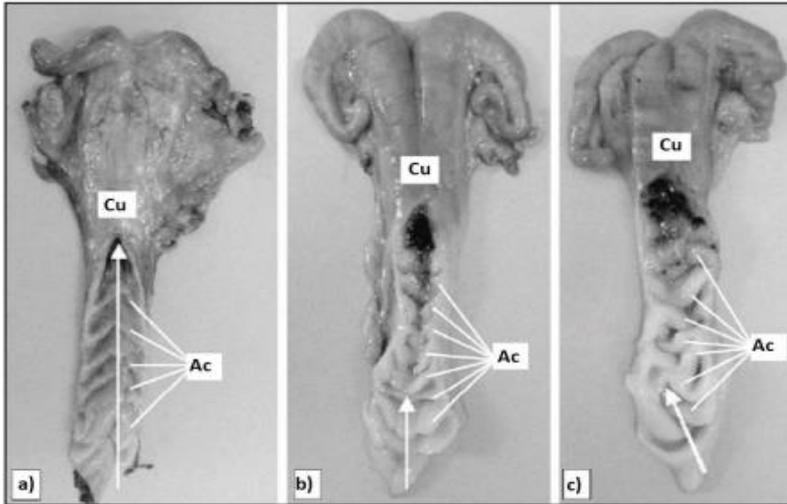


Figura 2: Clasificación morfológica del cérvix de ovejas adultas según el grado de complejidad estructural y su relación con la profundidad de penetración cervical: a) grado 1, cérvix con anillos cervicales (Ac) completos y alineados entre sí; b) grado 2, cérvix con algunos anillos completos y alineados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

En su eje longitudinal se pueden diferenciar al menos dos regiones (Halbert et al., 1990; Kershaw et al., 2005). La región caudal, va desde el orificio cervical externo hasta el tercer o cuarto anillo, los que están muy desarrollados, constituyéndose en la principal barrera para la canulación transcervical. La región craneal, contigua al cuerpo uterino, posee anillos más pequeños y definidos. Existe una gran variabilidad en la morfología cervical entre razas, categorías e individuos, tanto en las dimensiones del órgano, número y alineación de los anillos, como en la disposición de pliegues de la mucosa vaginal que obstruyen el orificio cervical externo (Halbert et al., 1990; Kershaw et al., 2005; Naqvi et al., 2005).

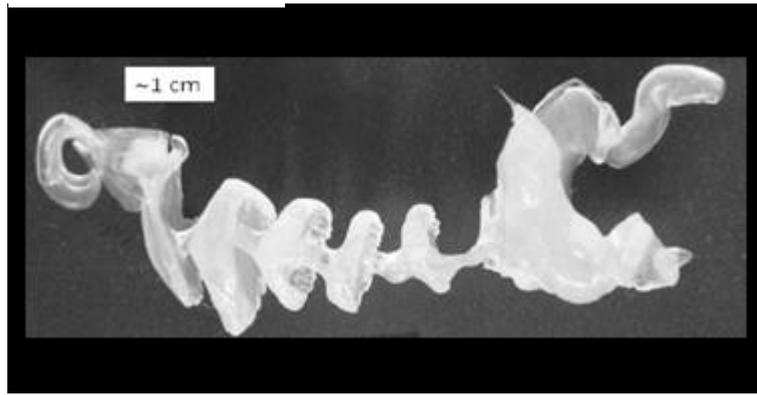


Figura 3: Molde de silicona del canal cervical de la oveja adulta. Naqvi et al., 2005.

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 (Campbell et al., 1996; Halbert et al., 1990). En el caso de ovinos el semen se deposita a la entrada del canal cervical, y en el mejor de los casos a 1 cm de profundidad. La tasa de parición obtenida después de la IA con semen congelado es baja debido a la incapacidad de los espermatozoides para atravesar la naturaleza tortuosa del canal cervical (Eppleston & Maxwell, 1993). La compleja anatomía del cuello uterino no facilita el paso para un catéter de 14g de inseminación (Naqvi et al., 2005; Rodríguez Gavancho et al., 2015). Además, en la gran mayoría de las ovejas sólo es posible la IA en el orificio cervical caudal, resultando en bajos índices de concepción cuando se utiliza semen congelado (Salamon & Maxwell, 2000).

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

2.3 Inducción de la dilatación cervical en ovinos

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

El ciclo estral es el resultado de una cadena de eventos coordinados fundamentalmente por cuatro órganos: cerebro, hipófisis, ovarios y útero, que establecen vías neuroendocrinas y endocrinas de comunicación coordinando la función reproductiva (Goodman, 1994). Está regulado por la interrelación entre las hormonas producidas por estos órganos: la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) del hipotálamo, la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) de la hipófisis, el estrógeno (E) y la inhibina de los folículos ováricos, la progesterona (P) y la oxitocina (Ox) del cuerpo lúteo y la prostaglandina F₂α (PGF₂α) del útero (Goodman, 1994).

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

El cérvix se hace permeable en dos situaciones reproductivas particulares: al estro, permitiendo el ascenso de los espermatozoides y al parto, permitiendo el descenso y la expulsión del feto (Heydon & Adams, 1979). Sufre cambios profundos durante el proceso de gestación y parto, basados especialmente en un activo metabolismo de su matriz extracelular, donde coexisten y se interrelacionan fenómenos moleculares y celulares, mayoritariamente descritos en la mujer y en roedores (El Maradny et al., 1997; Gorodeski, 1996). La coordinación de estos fenómenos depende de los E y la P, actuando a través de sus receptores específicos directamente (RE y RP, respectivamente) (Gorodeski, 1996; Stjernholm et al., 1996) o a través de otras hormonas.

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

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

La degradación de las fibras de colágeno depende de la actividad de las colagenasas, que integran la familia de las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs) (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 pro-enzimas (forma latente, L) y luego secretadas a la matriz extracelular donde son activadas (forma activada, A) (Hulboy et al., 1997). El proceso de activación ocurre mediante proteólisis limitada llevada a cabo fundamentalmente por otras MMPs. Las MMPs pueden ser reguladas por hormonas, citoquinas inflamatorias y factores de crecimiento y este control puede ejercerse a nivel transcripcional (regulación ejercida a nivel de la expresión de la enzima) y a nivel postranscripcional (regulación ejercida a nivel de activación de la enzima) (Hulboy et al., 1997; Nagase et al., 2006).

Existen interacciones bioquímicas entre los componentes estructurales de la matriz extracelular (MEC) del tejido conectivo del cérvix ovino, de los cuales el colágeno fibrilar y los glicosaminoglicanos (GAGs) son los más abundantes (Myers KM, Paskaleva AP, House M, Socrate S., 2008; Word RA, Li XH, Hnat M, Carrick K., 2007). Éstos son especialmente importantes durante el proceso de remodelación cervical que resulta en la dilatación cervical. La síntesis de PG E2 cervical durante el estro de la oveja sumado a la síntesis de GAG, provocarán la desagregación de fibras colágeno produciendo la dilatación cervical (Kershaw et al., 2009). A su vez, las metaloproteinasas de matriz (MMP) especialmente la MMP-2 y la MMP-9 participan en la degradación enzimática del colágeno en el cuello uterino (Rodríguez-Piñón et al., 2015). Estas presentan secuencias similares a la fibronectina que facilita la unión y la escisión del colágeno parcialmente desnaturalizado y están regulados por cambios hormonales. Son producidas como proenzimas (forma latente, L) y se secretan a la MEC donde se activarán por escisión proteolítica (forma activada, A) (Huldboy et al., 1997, Stygar et al., 2002)

Durante el ciclo natural de la oveja se encontró un aumento de la actividad cervical de las formas A y L de MMP-2 concomitantemente con una disminución de la concentración del colágeno y la agregación de fibras alrededor del estro. La MMP-2 se asoció con fibroblastos activos, mientras que la MMP-9 se relacionó con células implicadas en procesos inmunes e inflamatorios (Rodríguez-Piñón et al., 2015).

En función de lo anterior, la Ox y la PGE han sido utilizadas para dilatar el cérvix y facilitar su canulación, administradas solas (King et al., 2004; Stellflug et al., 2001) o combinadas (De Rossi et al. 2009; Falchi et al., 2012; Leethongdee et al., 2007). Considerando la vida media corta de la Ox (minutos), se desarrolló un análogo sintético de larga duración (12 horas), la Carbetocina (Cb). Presenta una actividad de unión al receptor de Ox similar al natural, pero tiene una vida media de 4 a 10 veces más prolongada que la Ox natural (Atke & Vilhardt, 1987). Esto

podría asegurar un efecto oxitócico lo suficientemente largo para desencadenar los procesos de dilatación cervical sin necesidad de usar dosis repetidas o altas dosis supra fisiológicas de Ox natural que posiblemente interfieran en la fertilidad. Además, se ha reportado que la Carbetocina posee una menor actividad uterotónica que la Ox natural (Atke & Vilhardt, 1987; Engstrom et al., 1998), por lo que la administración de Carbetocina podría ser una alternativa al uso de la Ox natural en la inducción de la dilatación cervical en ovejas.

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

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

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

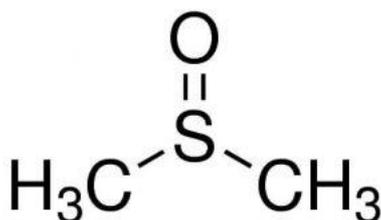


Figura 4. Estructura química de un dimetilsulfóxido (DMSO). (Gurtovenko & Anwar, 2007).

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

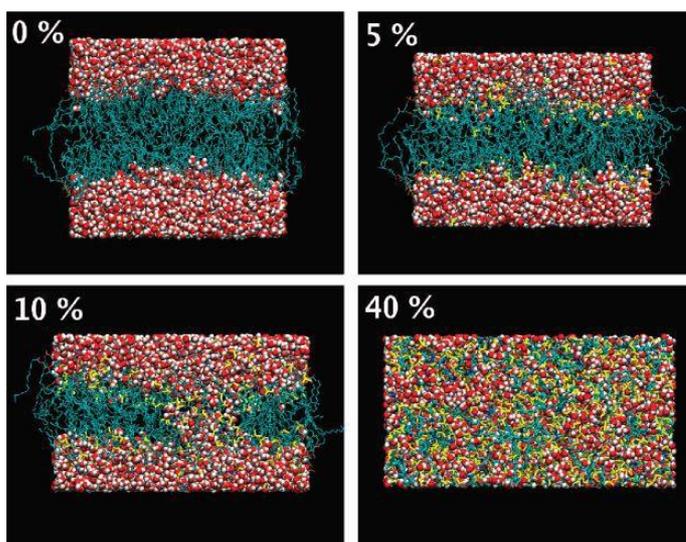


Figura 5. Distintos modos de acción de DMSO sobre membranas de fosfolípidos. Se presentan vistas laterales de las estructuras finales para los sistemas bicapa que contiene 0, 5, 10 y 40% en moles de DMSO (base libre de lípidos). Los lípidos se muestran en cian, el agua en rojo y DMSO en amarillo (Gurtovenko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

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

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS GENERALES Y ESPECIFICOS

3.1 HIPÓTESIS

3.1.1 HIPÓTESIS I:

La administración de DMSO a explantes de cérvix ovino, produce un aumento de la actividad de las MMP-2 y MMP-9.

3.1.2 HIPÓTESIS II:

La administración conjunta de DMSO y Cb a explantes de cérvix ovino, produce un aumento de la actividad de las MMP-2 y MMP-9 superior al que se obtendría con DMSO administrado solo.

3.2 OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

3.2.1 Objetivo general

Obtener evidencias acerca del efecto de la administración de DMSO y/o Cb sobre la actividad de las MMP-2 y -9, para aportar al desarrollo de la inducción farmacológica de la dilatación del cérvix ovino y facilitar la utilización de la IA transcervical en la oveja.

3.2.2 Objetivos Específicos

Determinar el efecto in vitro de la incubación por 12 h de dosis crecientes de DMSO sobre la actividad de las formas latente y activada de MMP-2 y MMP-9, en explantes de cérvix craneal y caudal ovino en fase folicular.

Determinar el efecto in vitro de la incubación por 12 h de dosis crecientes de DMSO en presencia de Cb sobre la actividad de las formas latente y activada de MMP-2 y MMP-9, en explantes de cérvix craneal y caudal ovino en fase folicular.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del cérvix

Se obtuvieron 8 tractos reproductivos de ovejas adultas en fase folicular, con folículo mayor a 8 mm y con punto ovulatorio presente a la inspección visual, sacrificadas en frigorífico Nirea S.A. (San Jacinto, situado en Ruta 7 km 59.500 Canelones, Uruguay).

Los cultivos de explantes se realizaron no más de 2 horas posteriores al sacrificio, en el laboratorio de Bioquímica, Facultad de Veterinaria.

Procesamiento de muestras e incubación de explantes.

El tracto reproductivo fue disecado y fotografiado. Se observaron dichos tractos, para determinar la etapa del ciclo estral en la que se encontraban las ovejas y posteriormente se separó el cérvix del resto del útero y trompas uterinas. Se disecaron los cérvix dividiéndolos en tercios y denominando cérvix craneal al

tercio contiguo al útero y caudal al contiguo a la vagina, descartando el tercio intermedio por ser una zona de pasaje. Los dos tercios seleccionados se fraccionaron en 10 partes homogéneas las cuales fueron pesadas y colocadas en pocillos de una placa de cultivo con medio MEM a 37 °C por 12 horas; a cada oveja correspondieron 2 placas; una para cérvix craneal y otra para cérvix caudal.

A la mitad de las muestras se les agregó concentraciones crecientes de DMSO de 0, 0.25, 0.5, 1.0 y 2.0 % (p/v) en medio MEM. A la otra mitad se les agregó una dosis fija de Carbetocina (100 ng/ml), además de las mismas dosis de DMSO. Luego fueron llevados a la estufa a 37°C por 12 horas. Posteriormente, los sobrenadantes fueron extraídos y almacenados a -80°C hasta su procesamiento.

Determinación de actividad de las Metaloproteinasas por zimografía en geles de poliacrilamida.

Consiste en una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) copolimerizado con gelatina, sustrato de las gelatinasas (MMP-2 y MMP-9). Luego de la electroforesis, se reconstituyen las condiciones de re-naturalización y recuperación de la actividad enzimática y se registra la actividad enzimática según el grado de degradación de la gelatina copolimerizada. Se utilizó la metodología según fue descrita en Marco et al. 2006. Alícuotas de los homogeneizados de tejido cervical fueron diluidas en SDS-buffer (pH 7.6) e incubadas a 37°C por 1 h antes de la electroforesis. La gelatina fue copolimerizada en un gel de poliacrilamida al 7.5%, con una concentración final de 2.5mg/ml y las condiciones de corrida fueron a 100V por 2 h. Posteriormente el gel fue lavado en Triton al 2.5% por 1 h a TA, enjuagado en agua destilada e incubado en buffer de desarrollo (Tris, pH 7.6) por 18 h a 37°C. Luego fue coloreado con azul de Coomassie, decolorado y secado. La degradación de la gelatina se manifestó como zonas claras sobre el gel azul. Para el cálculo de la masa molecular aparente de las bandas gelatinolíticas se utilizaron marcadores estándar de peso molecular (SDS7B2, Sigma). Formas A y L de las MMP-2 y MMP-9 recombinantes (M-9445 y M8945, Sigma) fueron corridas como controles positivos y como control negativo se corrió una muestra pre incubada con un buffer conteniendo EDTA, un quelante del zinc. Los geles fueron escaneados y la cuantificación de las bandas se realizó por densitometría (Image J), calculándose la concentración de cada forma de cada enzima (formas A y L de MMP-2 y de MMP-9) en ng/mg de tejido incubado, contra una curva de calibración confeccionada con diluciones seriadas de las formas A y L de los estándares recombinantes respectivos ($r=0.9858$ y $P<0.01$ y $r=0.9890$ y $P<0.032$, para las formas A y L, respectivamente). Se calculó la relación entre las formas A y L (Rel A/L) enzima activada y latente.

El mínimo detectable de la técnica fue 0.012 ng/mg de tejido para ambas formas A y L. El coeficiente de variación (CV) inter ensayo fue de 2.4, 6.0 y 10.3 para los blancos, formas A y L, respectivamente. El CV intraensayo de los estándares fue de 2%.

4.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se le realizó test de normalidad a todas las variables (tests de Shapiro–Wilk, Kolmogorov–Smirnov y D’Agostino-Pearson), al dar no normales se asumió que no tienen distribución Gaussiana y se utilizaron test no paramétricos para su análisis. Los datos (actividad de las formas A y L de las MMP-2 y MMP-9 en ng/mg de tejido) fueron analizadas mediante el test de Wilcoxon para muestras pareadas para detectar los efectos de la zona cervical (craneal y caudal) y para el efecto de la Cb (con o sin Cb) y mediante el Test de Friedman con un test posterior de Dunn’s para muestras pareadas, para detectar el efecto de las diferentes dosis de DMSO utilizadas (0, 0.25, 0.5, 1.0 y 2.0 %).

Los valores se expresan como la mediana, y los percentiles 25% (C1) y 75% (C3) y se presentan como gráficos “box and whisker plots” donde el 50% de los datos están dentro de la caja y la mediana está marcada con una línea horizontal y las barras representan los percentiles 25% (C1) y 75% (C3). La significación se fijó en $P < 0.05$, tomándose $0.05 \leq P < 0.1$ como una tendencia.

5. RESULTADOS

La actividad de las formas A y L de la MMP-9 fue escasa y esporádica, manifestándose como bandas tenues únicamente en el 19.4 % de las muestras corridas (31 de 160), sin un patrón detectable (Figura 6). Por lo tanto, la actividad de las formas A y L de la MMP-9 no fueron cuantificadas ni analizadas estadísticamente.

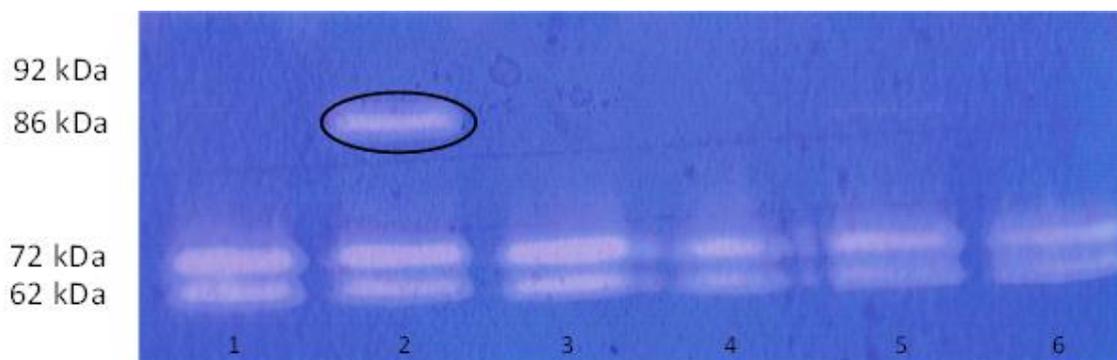


Figura 6. Zimografía de SDS PAGE co-polimerizado con gelatina, para la detección de la actividad MMP-2 y MMP-9 en cervix ovino. Líneas 1 a 6: sobrenadantes obtenidos de explantes cervicales incubados por 12 h. En la línea 2 se puede observar una banda que migró a 86 kDa y que se corresponde a la forma activada (A) de la MMP-9 y por encima, más tenue, su forma latente (L) de 92 kDa. En todas las líneas se evidencia bandas de actividad de las formas A y L de la MMP-2 de 72 y 62 kDa, respectivamente.

La actividad de la forma L de la MMP-2 (ng/mg de tejido) fue afectada por la zona cervical ($P < 0.05$). El cérvix craneal tuvo mayor actividad de L MMP-2 que el cérvix caudal (Figura 7).

La actividad de la forma L de la MMP-2 también fue afectada por el tratamiento con DMSO ($P < 0.005$). Las dosis 0.5, 1 y 2% mostraron mayor actividad de L MMP-2 que el control no tratado (Figura 8).

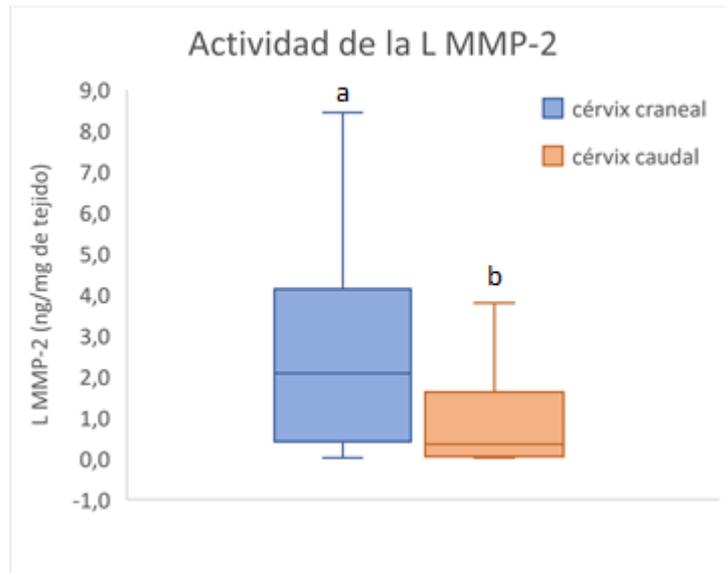


Figura 7: Actividad de la forma Latente (L) de la MMP-2 (ng/mg tejido), en el sobrenadante de explantes de cérvix craneal y caudal de ovejas en fase folicular ($n=8$). El 50% de los datos están dentro del rectángulo, la línea horizontal indica el valor de la mediana, la barra inferior representa el percentil 25% (C1) y la barra superior el percentil 75% (C3). Diferentes letras indican diferencias significativas con una $P < 0.05$.

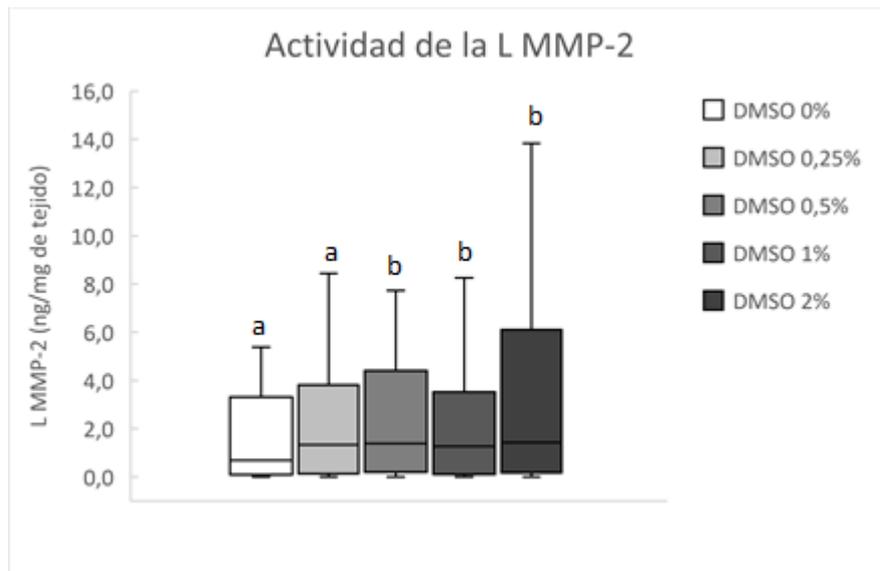


Figura 8: Actividad de la forma Latente (L) de la MMP-2 (ng/mg tejido) en el sobrenadante de explantes de cérvix de ovejas en fase folicular (n=8) incubados por 12 h en medio MEM con DMSO en concentraciones crecientes (0, 0.25, 0.5, 1 y 2%). El 50% de los datos están dentro del rectángulo, la línea horizontal indica el valor de la mediana, la barra inferior representa el percentil 25% (C1) y la barra superior el percentil 75% (C3). Diferentes letras indican diferencias significativas con una $P < 0.005$.

La actividad de la forma L de la MMP-2 también fue afectada por la interacción entre el tratamiento con DMSO y la zona cervical ($P < 0.0005$). La mayor actividad de la L MMP-2 en el cérvix craneal respecto al caudal, solo se manifestó en el tratamiento con DMSO 0.5% (Figura 9).

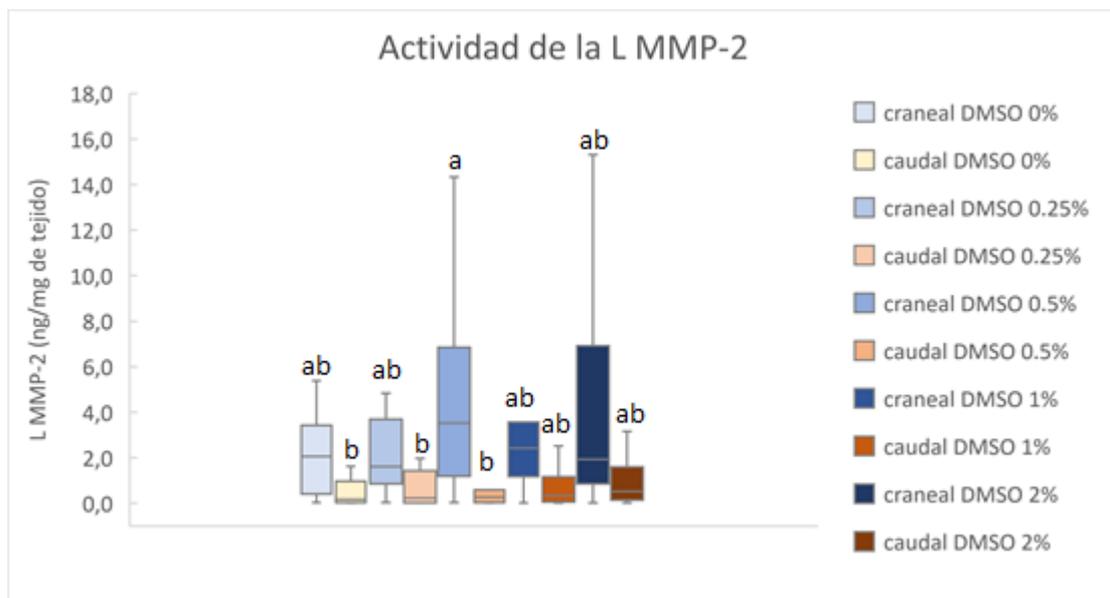


Figura 9: Actividad de la forma Latente (L) de la MMP-2 (ng/mg tejido) en el sobrenadante de explantes de cérvix craneal y caudal de ovejas en fase folicular (n=8) incubados por 12 h en medio MEM con DMSO en concentraciones crecientes (0, 0.25, 0.5, 1 y 2%). El 50% de los datos están dentro del rectángulo, la línea horizontal indica el valor de la mediana, la barra inferior representa el percentil 25% (C1) y la barra superior el percentil 75% (C3). Diferentes letras indican diferencias significativas con una $P < 0.0005$.

La actividad de la forma L de la MMP-2 también fue afectada por el tratamiento con Cb ($P < 0.005$). Los explantes tratados con Cb mostraron mayor actividad de la L MMP-2 que los no tratados (Figura 10).

La actividad de la forma L de la MMP-2 también fue afectada por la interacción entre el tratamiento con Cb y la zona cervical ($P < 0.001$). El cérvix craneal tuvo mayor actividad de la L MMP-2 respecto al cérvix caudal solo en presencia de Cb (Figura 11).

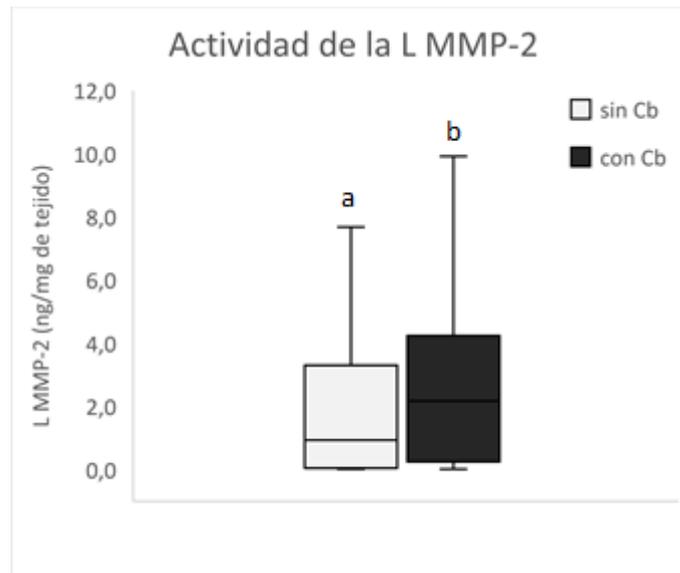


Figura 10: Actividad de la forma Latente (L) de la MMP-2 (ng/mg tejido) en el sobrenadante de explantes de cervix de ovejas en fase folicular (n=8) incubados por 12 h en medio MEM en presencia o no de Cb (100 ng/mL). El 50% de los datos están dentro del rectángulo, la línea horizontal indica el valor de la mediana, la barra inferior representa el percentil 25% (C1) y la barra superior el percentil 75% (C3). Diferentes letras indican diferencias significativas con una $P < 0.005$.

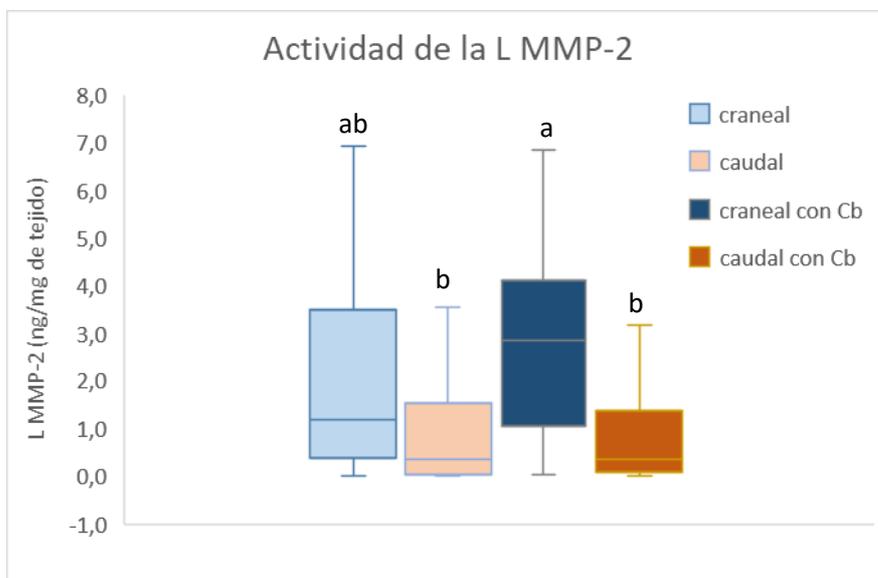


Figura 11: Actividad de la forma Latente (L) de la MMP-2 (ng/mg tejido) en el sobrenadante de explantes de cervix craneal y caudal de ovejas en fase folicular (n=8) incubados por 12 h en medio MEM en presencia o no de Cb (100 ng/mL). El 50% de los datos están dentro del rectángulo, la línea horizontal indica el valor de la mediana, la barra inferior representa el percentil 25% (C1) y la barra superior el percentil 75% (C3). Diferentes letras indican diferencias significativas con una $P < 0.01$.

La actividad de la forma L de la MMP-2 también fue afectada por la interacción entre el tratamiento con DMSO y el tratamiento con Cb ($P < 0.03$). Sin embargo, las diferencias se establecen entre series con más de un efecto fijo distinto (DMSO 0% vs. Cb+DMSO 1% o Cb+DMSO 2% y DMSO 0.25% vs. Cb+DMSO 1% o Cb+DMSO 2%, por lo que no es posible asignarles una interpretación. (Figura 12).

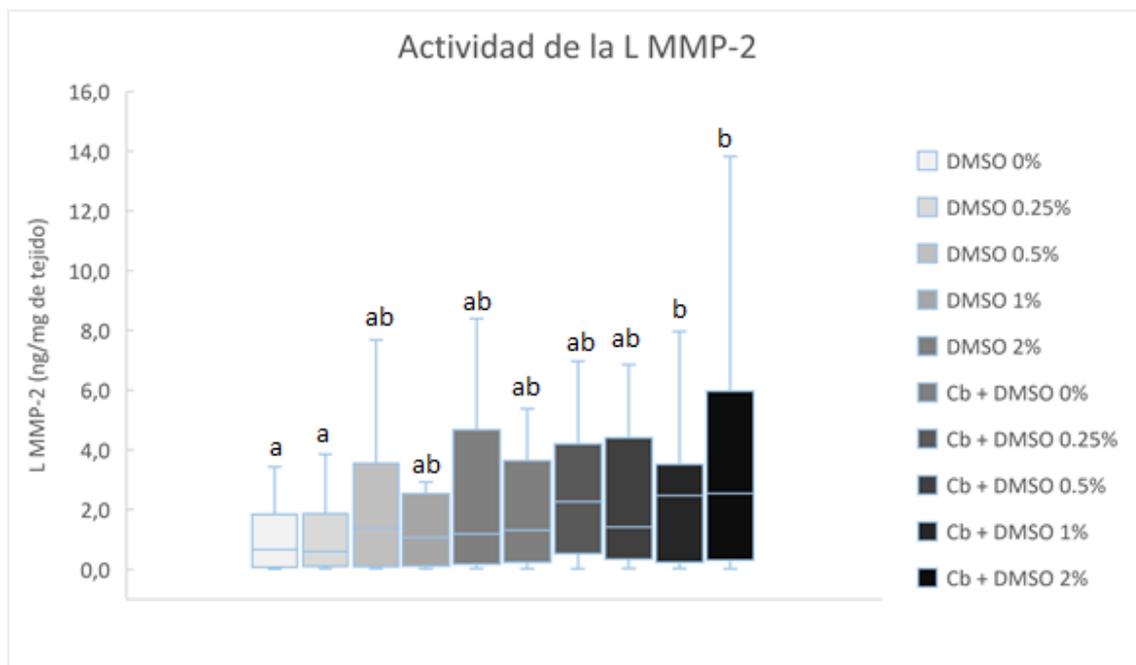


Figura 12: Actividad de la forma Latente (L) de la MMP-2 (ng/mg tejido) en el sobrenadante de explantes de cervix craneal y caudal de ovejas en fase folicular ($n=8$) incubados por 12 h en medio MEM con DMSO en concentraciones crecientes (0, 0.25, 0.5, 1 y 2%) en presencia o no de Cb (100 ng/mL). El 50% de los datos están dentro del rectángulo, la línea horizontal indica el valor de la mediana, la barra inferior representa el percentil 25% (C1) y la barra superior el percentil 75% (C3). Diferentes letras indican diferencias significativas con una $P < 0.05$.

La actividad de la forma A de la MMP-2 (mediana (C1, C3) en ng/mg de tejido) no fue afectada por la zona cervical, ni por el tratamiento con DMSO, siendo 1.62 (0.40, 2.32), y 1.48 (0.68, 2.45) en cervix craneal y caudal y 1.65 (0.35, 2.31) y 1.24 (0.60, 2.17) en ausencia o presencia de Cb, respectivamente ($P > 0.05$).

La actividad de la forma A de la MMP-2 fue mayor en el tratamiento con DMSO 1% respecto al control no tratado, siendo 1.33 (0.45, 2.20) y 2.0 (0.60, 2.63) ($P < 0.03$).

La relación entre las formas A y L de la MMP-2 (Rel A/L) fue afectada por la zona cervical ($P < 0.002$). El cervix craneal tuvo menor Rel A/L que el cervix caudal (Figura 13).

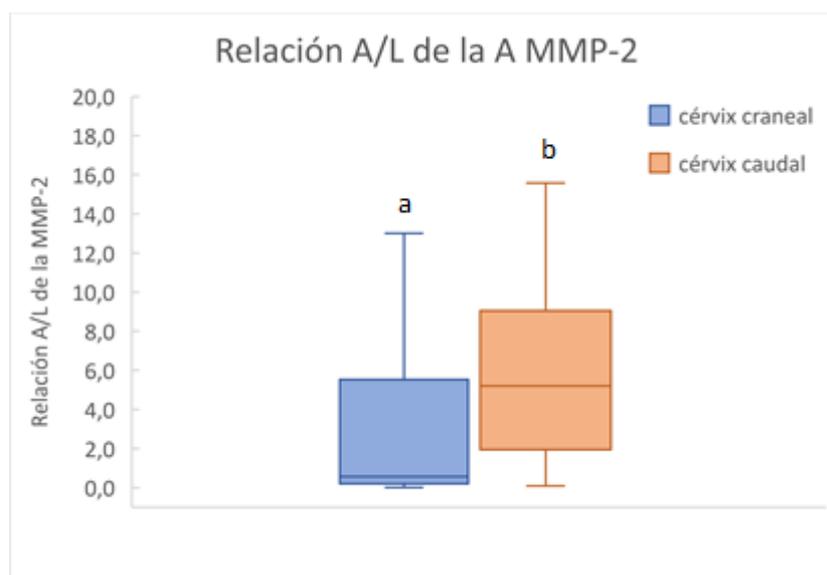


Figura 13: Relación entre la actividad de las formas activada (A) y latente (L) de la MMP-2, en el sobrenadante de explantes de cervix craneal y caudal de ovejas en fase folicular (n=8). El 50% de los datos están dentro del rectángulo, la línea horizontal indica el valor de la mediana, la barra inferior representa el percentil 25% (C1) y la barra superior el percentil 75% (C3). Diferentes letras indican diferencias significativas con una $P < 0.05$.

La Rel A/L de la MMP-2 (mediana (C1, C3), fue menor en el tratamiento con DMSO 1% respecto al control no tratado, siendo 0.39 (0.20, 4.64) y 1.50 (0.44, 5.64) ($P < 0.05$).

La relación entre las formas A y L de la MMP-2 (Rel A/L) no fue afectada por el tratamiento con Cb, siendo 1.57 (0.26, 6.99) y 1.03 (0.22, 5.71) en ausencia o presencia de Cb, respectivamente ($P > 0.05$).

6. DISCUSION

En esta Tesis se confirma el predominio de la MMP-2 sobre la MMP-9, en la participación en los procesos de remodelación cervical de la oveja. Además, se reportan evidencias de que el DMSO es capaz de aumentar la actividad de la MMP-2, haciéndolo con mayor intensidad en presencia de Cb.

En el 80,6% de las muestras analizadas no hubo evidencia de actividad de la MMP-9 y en el restante 19,4%, las bandas fueron tenues y sin un patrón identificable por oveja, zona cervical o tratamiento. Esos resultados están en acuerdo con estudios anteriores in vivo en cervix de ovejas durante el ciclo estral, durante el ciclo estral inducido en el anestro estacional y durante el desarrollo prepuberal (Rodríguez-Piñón et al., 2015, 2018 y 2019), donde la actividad de la MMP-9 también fue escasa y ocasional. Estos resultados reafirman el concepto de que la actividad gelatinasa en el cervix de la oveja no preñada es ejercida

predominantemente por MMP-2. Adicionalmente, mediante inmunohistoquímica en cortes de cérvix de oveja (Rodríguez-Piñón et al., 2015) y humano (Stygar et al., 2002), la MMP-9 fue localizada en células de respuesta inmuno/inflamatoria, en cambio la MMP-2 se detectó asociada a los fibroblastos activos. La escasa actividad de la MMP-9 y su asociación con procesos de tipo inmune o inflamatorios, sugiere que este tipo de procesos no son predominantes en las modificaciones de la matriz extracelular cervical en ovejas vacías (Rodríguez-Piñón 2015), como si fue reportado en mujeres (Bakker et al., 2017; Sahlin et al., 2008) y vacas (Van Engelen et al., 2008) gestantes a término. Así mismo, de nuestro experimento tampoco surgen evidencias de que los tratamientos con Cb y/o DMSO hayan afectado la actividad de la MMP-9, coincidiendo con la escasa actividad de la MMP-9 reportada en explantes de cérvix de ovejas en anestro incubados con Cb, Furoxano o DMSO (Paiva & De Cuba 2020). Si bien en nuestro modelo in vitro, era esperable una escasa actividad de la MMP-9, dado que el desencadenamiento de procesos inflamatorios infiltrantes en explantes estaría detenido, los tratamientos con Cb y/o PGE2 tampoco afectaron la actividad de la MMP-9 en experimentos in vivo (Casuriaga, 2019).

En nuestro experimento, el cérvix craneal tuvo mayor actividad de L MMP-2 que el cérvix caudal, acompañado de una menor relación A/L, sin diferencias en la actividad de la A MMP-2 entre zonas cervicales. Cuando los explantes cervicales fueron tratados con DMSO 0.5% o con Cb, la actividad de la forma L de la MMP-2 también fue mayor en el cérvix craneal respecto al caudal. Esto coincide con la mayor actividad de la L MMP-2 en el cérvix craneal respecto al caudal en experimentos in vivo con ovejas en anestro estacional (Rodríguez-Piñón et al., 2018). Sin embargo, no hubo diferencias entre zonas cervicales en la actividad de las formas A y L MMP-2 en experimentos in vivo, con ovejas ciclando o comenzando a ciclar (Rodríguez-Piñón et al., 2015 y 2019) y tampoco en experimentos in vitro, con explantes de cérvix de ovejas en anestro (Paiva & De Cuba, 2020). En conjunto, los resultados parecen estar indicando que el cérvix craneal tendría un mayor potencial gelatinolítico latente que el cérvix caudal. Sin embargo, el hecho de que tanto la actividad de la forma L MMP-2, como la de la A MMP-2, fueron menores en el cérvix craneal respecto al caudal en experimentos in vivo con ovejas durante la ovulación inducida, (Casuriaga, 2019), no permite ser concluyentes al respecto.

El tratamiento con DMSO a dosis de 0.5, 1 y 2% aumentó la actividad de la forma L de la MMP-2 respecto al control no tratado. Si bien la actividad de la forma A MMP-2 también aumentó con la dosis de 1% de DMSO, éste aumento fue de menor intensidad que el registrado en la forma L MMP-2, dado que la relación A/L disminuyó con la misma dosis de DMSO. Esto sugiere que el efecto del DMSO sobre la actividad de la MMP-2 se ejercería fundamentalmente sobre la forma L MMP-2. En forma similar, el cultivo con DMSO 2% de explantes de cérvix de ovejas en anestro también disminuyó la relación A/L de MMP-2, a la vez que aumentó la actividad de ambas formas L y A MMP-2 (Paiva & De Cuba, 2020).

No hemos encontrado otros reportes del efecto del DMSO sobre la actividad de estas enzimas en el cérvix ovino, ni en cérvix de otras especies, ni en otros tejidos. El mecanismo de acción del DMSO sobre las membranas celulares descrito a escala atómica incluye la interacción del DMSO con la cabeza hidrofílica de los fosfolípidos, produciendo la separación entre ellos y, dependiendo de la dosis, desde un adelgazamiento y aumento de la fluidez, hasta la formación de poros transitorios e incluso permanentes a altas concentraciones, que aumentan progresivamente la permeabilidad celular (Gurtovenko & Anwar, 2007; Notman et al., 2006). En base a esto, podemos especular que un aumento en la permeabilidad celular inducido por el DMSO a concentraciones entre el 0.5 y el 2%, permitiría el pasaje de la proenzima intracelular de la MMP-2 (la forma L MMP-2) hacia el espacio intercelular y de ahí al sobrenadante, donde ocurrirían las reacciones de activación de la enzima a su forma A MMP-2.

En nuestro experimento, el tratamiento *in vitro* con Cb (100 ng/mL) aumentó la actividad de la forma L de la MMP-2 respecto a los no tratados con Cb, sin afectar la actividad de la forma A MMP-2 ni la relación A/L de MMP-2. En el mismo sentido, pero en explantes de cérvix de ovejas en anestro, la misma dosis de Cb desplazó la relación A/L hacia la forma latente, dado que disminuyó la relación A/L de MMP-2 sin afectar las formas L y A MMP-2 (Paiva & De Cuba, 2020). Ambos experimentos parecen indicar que la Cb induciría un aumento de la actividad de la L MMP-2 en el sobrenadante de cultivo. Contrariamente, en el modelo *in vivo* utilizando cérvix obtenidos de ovejas en fase folicular y tratadas por 12 h con Cb *im* (1ug/Kg), la relación A/L de MMP-2 aumentó, sin modificar la actividad de las formas L y A de MMP-2 (Casuriaga, 2019). En este último trabajo, el tratamiento con Cb también disminuyó el contenido de colágeno cervical, a la vez que aumentó la penetrabilidad cervical respecto a los controles no tratados, por lo que la autora plantea que una activación de L MMP-2 a A MMP2, dependiente de oxitocina sería un mecanismo probable por el cual la Cb induciría la degradación del colágeno y el aumento de la penetrabilidad cervical. Esta discrepancia entre el modelo *in vitro* y el modelo *in vivo* podría deberse a que el modelo *in vitro* de explante cervical podría ser disruptor de los procesos de activación de la MMP-2, que sí podrían darse en el tejido cervical íntegro (*in vivo*). Sin embargo, la incubación con Cb también aumentó la actividad de la forma A respecto a la L MMP-2 en experimento *in vitro* con explantes de cérvix obtenidos de ovejas al momento de la IA a tiempo fijo (Rodríguez-Piñón & García-Barcelo, 2019). En este último experimento, así como en el experimento *in vivo* de Casuriaga (2019), los cérvix fueron obtenidos al momento de la IA a tiempo fijo, monitorizada por ultrasonografía ovárica, de ovejas con ovulación sincronizada. Por el contrario, en nuestro experimento y en el experimento de Paiva & De Cuba (2020), los cérvix fueron obtenidos de ovejas sacrificadas en frigorífico que tenían un folículo grande con punto ovulatorio visible. Considerando lo anterior, podría plantearse que la precisión del momento

periovulatorio en el cual se obtienen las muestras podría ser determinante para detectar o no un aumento en la activación de la MMP-2. Efectivamente, cabe esperar que las muestras obtenidas de ovejas con ovulación sincronizada y al momento de la IA a tiempo fijo, estuviesen en una fase folicular más tardía, expuestas por más tiempo a los altos niveles de estrógenos foliculares y que a la vez sean menos dispersas, respecto a las obtenidas de ovejas de frigorífico tras la observación visual de folículos grandes con punto ovulatorio. Esta exposición mayor a niveles de estrógenos foliculares puede ser importante para lograr una buena capacidad de respuesta del cérvix a la oxitocina, en términos de aumento del Receptor de Oxitocina (Rodríguez et al., 2014). Reafirma lo anterior, el hecho de que no se hubiera obtenido evidencias de que la Cb aumente la actividad de la forma A MMP-2 en experimentos in vitro con explantes obtenidos de ovejas en anestro, donde la exposición a estrógenos foliculares no existió (Paiva & De Cuba, 2020).

Interesantemente, en nuestro experimento, la actividad de la forma L de la MMP-2 fue afectada globalmente por la interacción entre el tratamiento con DMSO y el tratamiento con Cb. Si bien las diferencias en actividad de L MMP-2 parecen ser a favor del tratamiento combinado respecto al tratamiento solo con DMSO, las diferencias estadísticas se establecen solo entre series que no se pueden comparar entre sí, por lo que es difícil de interpretar el significado. Similarmente, en el mismo modelo de explantes de cérvix de ovejas en anestro, el tratamiento combinado con Cb y DMSO (100 ng/mL y 2%, respectivamente), produjo un aumento de la actividad de ambas formas (L y A MMP-2) por encima de sus respectivos controles tratados solo con DMSO o Cb (Paiva & De Cuba, 2020). Ambos experimentos in vitro muestran que, en explantes de cérvix de ovejas, habría un efecto positivo de la Cb sobre la actividad de la MMP-2, que se manifestaría en presencia de DMSO. Además, el efecto positivo de la Cb en presencia de DMSO sobre la actividad de la MMP-2, se ejercería en igual proporción sobre ambas formas A y L, dado que el tratamiento combinado no afectó la relación A/L de MMP-2 en nuestro experimento, ni en el experimento de Paiva & De Cuba (2020). Estos datos sugieren que la Cb estaría estimulando la actividad de la MMP-2 por un mecanismo distinto y complementario al del DMSO. Se puede especular que el DMSO facilitaría la salida de la L MMP-2 hacia el espacio intercelular y de ahí al sobrenadante y que la fuga de la L MMP-2 de la célula al exterior, estaría acompañada de la activación a A MMP-2 inducida por Cb.

7. CONCLUSIONES

7.1 La escasa actividad de la MMP-9 registrada sugiere que esta enzima no es predominante en las modificaciones de la matriz extracelular cervical en ovejas vacías.

7.2 El tratamiento con DMSO a dosis de 0.5, 1 y 2% y el tratamiento con Cb a 100 ng/mL, aumentaron la actividad de la forma L de la MMP-2 respecto a sus controles no tratados.

7.3 La actividad de la forma L de la MMP-2 fue afectada globalmente por la interacción entre el tratamiento con DMSO y el tratamiento con Cb, a favor del tratamiento combinado y sin afectar la relación A/L.

7.4 Las evidencias experimentales reportadas permiten especular que la Cb estaría estimulando la actividad de la MMP-2 por un mecanismo distinto y complementario al del DMSO: un aumento en la permeabilidad celular inducido por el DMSO a concentraciones entre el 0.5 y el 2%, permitiría el pasaje de la proenzima intracelular de la MMP-2 (la forma L MMP-2) hacia el espacio intercelular y de ahí al sobrenadante, donde ocurrirían las reacciones de activación de la enzima a su forma A MMP-2, dependientes de Ox.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Atke, A., & Vilhardt H. (1987). Uterotonic activity and myometrial receptor affinity of 1-deamino-1-carba-2-tyrosine(O-methyl)-oxytocin. *Acta Endocrinologica (Copenhagen)*, 115(1), 155-160.
- Bajcsy, Á.C., Szenci, O., van der Weijden, G.C., Doornenbal, A., Maassen, F., Bartyik, J., & Taverne, M.A.M. (2006). The effect of a single oxytocin or carbetocin treatment on uterine contractility in early postpartum dairy cows. *Theriogenology* 65, 400-414.
- Campbell, J.W., Harvey, T.G., McDonald, M.F., & Sparksman, R.I. (1996). Transcervical insemination in sheep: an anatomical and histological evaluation. *Theriogenology*, 45(8), 1535-1544.
- Casuriaga, D. (2019). *Dilatación cervical en la oveja: Efectos de tratamientos con análogos de Oxitocina y de Prostaglandina E2 de larga duración* [Tesis de maestría, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República]. Colibrí. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/35830/1/FV-33828.pdf>
- Candappa, I.B., & Bartlewski, P.M. (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(1), 162-175.

- De Rossi, R., Carneiro, R. P., Ossuna, M. R., Zanenga, N. F., Alves, O. D., Jorge, T. P., Costa e Silva, E. V., & 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.
- El Maradny, E. M. A. D., Kanayama, N., Kobayashi, H., Hossain, B., Khatun, S., Liping, S., Kobayashi, T., & Terao, T. (1997). The role of hyaluronic acid as a mediator and regulator of cervical ripening. *Human Reproduction (Oxford)*, 12(5), 1080-1088.
- Engstrøm, T., Barth, T., Melin, P., & Vilhardt, H. (1998). Oxytocin receptor binding and uterotonic activity of carbetocin and its metabolites following enzymatic degradation. *European Journal of Pharmacology*, 355, 203-210.
- Eppleston, J., & Maxwell, W. M. C. (1993). Recent attempts to improve the fertility of frozen ram semen inseminated into the cervix. *Wool Technology and Sheep Breeding*, 41 (3), 291-302.
- Eppleston, J., Salamon, S., Moore, N.H., & Evans, G. (1994). The depth of cervical insemination and site of intrauterine insemination and their relationship to the fertility of frozen-thawed ram semen. *Animal Reproduction Science*, 36, 211-225.
- Falchi, L., Taema, M., La Clanche, S., & Scaramuzzi, R.J. (2012). The pattern of cervical penetration and the effect of topical treatment with prostaglandin and/or FSH and oxytocin on the depth of cervical penetration in the ewe during the peri-ovulatory period. *Theriogenology*, 78, 376-384.
- 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(1-2), 119-129.
- Goodman, R. L. (1994). Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. En E. Knobil, & J. D. Neill (Eds.), *The Physiology of Reproduction* (pp. 659-710). Raven.
- Gurtovenko, A.A., & Anwar, J. (2007). Modulating the structure and properties of cell membranes: the molecular mechanism of action of dimethyl sulfoxide. *The Journal of Physical Chemistry B*, 111(35), 10453-10460.
- Halbert, G.W., Dobson, H., Walton, J.S., & Buckrell, B.C. (1990a). The structure of the cervical canal of the ewe. *Theriogenology*, 33, 977-992.

- Heydon, R. A., & 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.
- Hulboyl DL., Rudolph LA & Matrisian LM. Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Mol Hum Reprod* 1997; 3:27–45.
- Kershaw, C.M., Khalid M., McGowan MR., Ingram K., Leethongdee S., Wax G & Scaramuzzi R.J. (2005). The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology* 64: 1225-1235.
- Kershaw, C.M., Scaramuzzi, R.J., McGowan, M.R., Wheeler-Jones, C.P & Khalid, M. (2007). *Biology of Reproduction*, 76: 124- 129.
- Kershaw-Young C.M., Khalid M., McGowan, M.R., Pitsillides, A.A., & Scaramuzzi R.J. The mRNA expression of prostaglandin E receptors EP2 and EP4 and the changes in glycosaminoglycans in the sheep cervix during the estrous cycle. *Theriogenology* 2009; 72:251–61.
- King M.E., McKelvey, W.A., Dingwall, W.S., Matthews, K.P., Gebbie, F.E., Mylne, M.J., Stewart, E., & Robinson, J.J. (2004). Lambing rates and litter sizes following intrauterine or cervical insemination of frozen/thawed semen with or without oxytocin administration. *Theriogenology* 62: 1236-1244.
- Leethongdee, S., Kershaw-Young, C.M., Scaramuzzi, R.J., & Khalid, M. (2010). Intracervical 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., & 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(4), 767-777.
- Leethongdee, S., Kershaw-Young, C. M., Scaramuzzi, R. J., & Khalid, M. (2010). Intra-cervical application of Misoprostol at estrus alters the content of cervical hyaluronan and the mRNA expression of follicle stimulating hormone receptor (FSHR), luteinizing hormone receptor (LHR) and cyclooxygenase-2 in the ewe. *Theriogenology*, 73(9), 1257-1266.
- Matthews, E. L., & Ayad, V. J. (1994). Characterization and localization of a putative oxytocin receptor in the cervix of the oestrous ewe. *Journal of endocrinology*, 142(3), 397-405.
- Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. (2011). Producción animal. En Censo general Agropecuario 2011. Resultados definitivos (pp. 39-47). DIEA.

- Rocanova, M. (2022). *El rubro ovino en el Uruguay: tradición, innovación y oportunidades*.
https://www.sul.org.uy/descargas/lib/Sostenibilidad_Cadena_ovina_y_ODS_Abril_2022.pdf
- Robinson, J. J., McKelvey, W. A. C., King, M. E., Mitchell, S. E., Mylne, M. J. A., McEvoy, T. G., ... & Williams, L. M. (2011). Traversing the ovine cervix—a challenge for cryopreserved semen and creative science. *Animal*, 5(11), 1791-1804.
- Rodríguez Piñón, M. (2003). Importancia del cérvix ovino como barrera para la Inseminación Artificial. Unguerfeld, R. *Reproducción de los Animales Domésticos*. Montevideo, MELIBEA Ediciones, 2, 353-364.
- Rodríguez Piñón, M. (2006). *Receptores de las hormonas esteroideas sexuales en cérvix ovino: estudios en corderas pre-púberes y en ovejas adultas durante el ciclo estral natural e inducido*. [Tesis de maestría, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República]. Colibrí
<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/24124/1/FV-27428.pdf>.
- Rodríguez Piñón, M., Tasende, C., Puime, P., & Garófalo, E. G. (2008). Oestrogen and progesterone receptor binding capacity and oestrogen receptor alpha expression (ER α mRNA) along the cervix of cycling ewes. *Reproduction, Fertility and Development*, 20(3), 350-356.
- Rodríguez Piñón, M., Gonzalez, R., Tasende, C., Bielli, A., Genovese, P., & Garófalo, E. G. (2014). Cervical changes in estrogen receptor alpha, oxytocin receptor, LH receptor, and cyclooxygenase-2 depending on the histologic compartment, longitudinal axis, and day of the ovine estrous cycle. *Theriogenology*, 81(6), 813-824.
- Rodríguez Piñón, M. (2015). *Estudios endócrinos y moleculares en el Cérvix ovino durante el Ciclo Estral y el Anestro Estacional*. [Tesis de Doctorado. Facultad de Veterinaria, UdelaR, 66 p.] Colibrí.
<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/23999/1/FV-31594.pdf>
- Rodríguez Piñón et al. (2018). *Animal Production Science*, 58:244–251.
- Rodríguez Piñón, M., & García Barcelo, G. (2019). Efectos de la Oxitocina y/o Prostaglandina E2 de larga acción sobre la actividad colagenas en explantes de cérvix ovino. *Congreso Nacional de Biociencias, Montevideo, Uruguay*.
- Rodriguez, F., Muscari, J., & Sacsara, R. (2015). Características morfométricas del cuello uterino de la oveja corriedale. *Spermova*, 5, 71-74.

- Ross, F., Hernández, P., Porcal, W., López, G.V., Cerecetto, H., González, M., Basika, T., Carmona, C., Fló, M., Maggioli, G., Bonilla, M., Gladyshev, V.N, Boiani, M., & Salinas, G (2012). *PLoS One* 7: e35033.
- Salamon, S., & Maxwell, W. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62: 77-111.
- Sayre, B.L., & Lewis, G.S. (1996). Cervical dilation with exogenous oxytocin does not affect sperm movement into the oviducts in ewes. *Theriogenology* 45: 1523-1533.
- Sayre, B.L., & Lewis, G.S. (1997). Fertility and ovum fertilization rate after laparoscopic or transcervical intrauterine artificial insemination of oxytocin-treated ewes. *Theriogenology* 48: 267-275.
- Scaramuzzi, R. J., Adams, N. R., Baird, D. T., Campbell, B. K., Downing, J. A., Findlay, J. K., ... & Tsonis, C. G. (1993). A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reproduction, fertility and development*, 5(5), 459-478.
- Stellflug, J. N., Wulster-Radcliffe, M. C., Hensley, E. L., Cowardin, E. A., Seals, R. C., & Lewis, G. S. (2001). Oxytocin-induced cervical dilation and cervical manipulation in sheep: effects on laparoscopic artificial insemination. *Journal of animal science*, 79(3), 568-573.
- Stjernholm, Y., Sahlin, L., Åkerberg, S., Elinder, A., Eriksson, H. A., Malmström, A., & Ekman, G. (1996). Cervical ripening in humans: potential roles of estrogen, progesterone, and insulin-like growth factor-I. *American journal of obstetrics and gynecology*, 174(3), 1065-1071.
- Stygar, D., Wang, H., Vladoic, Y.S., Ekman, G., Eriksson, H., & Sahlin, L. Increased level of matrix metalloproteinases 2 and 9 in the ripening process of the human cervix. *Biol Reprod* 2002; 67:889–94.
- Word, R.A., Li, X.H., Hnat, M., & Carrick, K. Dynamics of cervical remodeling during pregnancy and parturition: mechanisms and current concepts. *Semin Reprod Med* 2007; 25:69–79.
- Wulster-Radcliffe, M. C., Wang, S., & Lewis, G. S. (2004). Transcervical artificial insemination in sheep: effects of a new transcervical artificial insemination instrument and traversing the cervix on pregnancy and lambing rates. *Theriogenology*, 62(6), 990-1002.