



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

# **Inseminación intracervical con semen congelado en ovinos tratados con carbetocina: penetración cervical, fertilidad y prolificidad en ovejas merino australiano y dohne**

Anthony Burton Facio

Magíster en Ciencias Agrarias  
Opción Ciencias Animales

Abril, 2024

**Inseminación intracervical con semen  
congelado en ovinos tratados con  
carbetocina: penetración cervical,  
fertilidad y prolificidad en ovejas merino  
australiano y dohne**

Anthony Burton Facio

Magíster en Ciencias Agrarias  
Opción Ciencias Animales

Abril, 2024

Tesis aprobada por el tribunal integrado por el DMTV, PhD Marcelo Rodríguez Piñón, el DMTV, PhD Julio Olivera Muzzante y el Ing. Agr. PhD Daniel Fernández Abella el 25/04/2024. Autor: Ing. Agr. Anthony Burton Facio. Director: DMTV, PhD Jorge Gil. Codirectora: DMTV, PhD Elize van Lier.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero agradecerle a mi hermosa familia: Alejandra, María Paz y Pilar, por brindarme todo su apoyo y comprensión. Gracias por todo el cariño y amor que me brindan todos los días.

A mis tutores, DMTV, PhD Jorge Gil y DMTV, PhD Elize van Lier, por contribuir en mis estudios de posgrado, pero por sobre todo por alentarme a mejorar cada día más.

A los integrantes del tribunal, DMTV, PhD Marcelo Rodríguez Piñón, DMTV, PhD Julio Olivera Muzzante e Ing. Agr. PhD Daniel Fernández Abella, por los comentarios y los aportes al trabajo durante las diferentes etapas de esta investigación.

Al establecimiento agropecuario Sucesores de Rudecindo Moraes-Artigas: Dra. Manuela Malvasio y Dr. Mauricio Biassini, por abrirme las puertas de su casa y poner a mi disposición recursos para que esta investigación salga adelante.

A todos los estudiantes, amigos y funcionarios, quienes desinteresadamente me ayudaron durante los experimentos: sin ustedes esto no hubiese sido posible.

A la querida EEFAS, lugar donde trabajo, por permitirme desarrollar la actividad docente en torno a la oveja, por permitirme hacer y aprender.

## Tabla de contenido

	página
Página de aprobación.....	III
Agradecimientos.....	IV
Resumen.....	IX
Summary.....	X
<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Anatomía del cérvix ovino.....</b>	<b>3</b>
1.1.1. <u>Anatomía descriptiva.....</u>	3
1.1.2. <u>Influencia de la raza y la edad de los ovinos.....</u>	6
<b>1.2. Fisiología del cérvix.....</b>	<b>10</b>
1.2.1. <u>Ciclo estral de la oveja.....</u>	10
1.2.2. <u>Etapas del ciclo estral ovino.....</u>	11
1.2.2.1. Proestro.....	11
1.2.2.2. Estro.....	12
1.2.2.3. Metaestro.....	13
1.2.2.4. Diestro.....	14
1.2.3. <u>Hormonas asociadas al ciclo estral ovino y la dilación cervical.....</u>	15
1.2.4. <u>Características del moco cervical.....</u>	17
<b>1.3. Técnicas de inseminación artificial en ovinos con semen congelado.....</b>	<b>19</b>
1.3.1. <u>Intrauterina por vía laparoscópica.....</u>	19
1.3.2. <u>Cervical e intracervical.....</u>	20
1.3.3. <u>Técnica de Guelph.....</u>	21
<b>1.4. Características del semen congelado que condicionan la fertilidad obtenida.....</b>	<b>22</b>
<b>1.5. Métodos para mejorar la penetrabilidad cervical en ovinos.....</b>	<b>23</b>
1.5.1. <u>Modificaciones en los instrumentos utilizados durante la inseminación.....</u>	23
1.5.2. <u>Modificaciones de las técnicas de inseminación.....</u>	24

1.5.3. <u>Tratamientos hormonales</u> .....	25
1.6. <b>Carbetocina</b> .....	29
1.7. <b>Hipótesis y objetivos</b> .....	29
1.7.1. Hipótesis.....	29
1.7.2. <u>Objetivo general</u> .....	30
1.7.3. <u>Objetivos específicos</u> .....	30
1.8. <b>Estrategia de investigación</b> .....	30
1.8.1. <u>Generalidades</u> .....	30
1.8.2. <u>Penetración cervical y penetrabilidad espermática del moco cervical en ovejas multíparas merino australiano</u> .....	31
1.8.3. <u>Penetración cervical, concentración de prostaglandina E2 en moco cervical, fertilidad y prolificidad en ovejas nulíparas, primíparas y multíparas merino dohne</u> .....	31
2. <b><u>Materiales y métodos</u></b> .....	32
2.1. <b>Penetración cervical y penetrabilidad espermática del moco cervical en ovejas multíparas merino australiano</b> .....	32
2.1.1. <u>Ubicación, animales y alimentación</u> .....	32
2.1.2. <u>Diseño experimental</u> .....	33
2.1.3. <u>Protocolo de sincronización de la ovulación</u> .....	33
2.1.3.1. Protocolo de sincronización de ovejas merino australiano.....	33
2.1.3.2. Protocolo de androgenización de los capones.....	34
2.1.4. Toma de muestras y registros.....	35
2.1.4.1. Diagnóstico ovárico, tasa ovulatoria potencial, penetración cervical y tasa ovulatoria.....	35
2.1.4.2. Penetración cervical.....	35
2.1.4.3. Penetrabilidad espermática del moco cervical <i>in vitro</i> .....	36
2.1.4.4. Determinación de estradiol y progesterona.....	37
2.2. <b>Penetración cervical, concentración de prostaglandina E2 en moco cervical, fertilidad y prolificidad en ovejas nulíparas, primíparas y multíparas merino dohne</b> .....	37
2.2.1. <u>Ubicación, animales y alimentación</u> .....	37

2.2.2. <u>Diseño experimental</u> .....	38
2.2.3. <u>Protocolo de sincronización de la ovulación</u> .....	38
2.2.3.1. Protocolo de sincronización de ovejas merino dohne.....	38
2.2.3.2. Protocolo de androgenización de los capones.....	41
2.2.4. <u>Características del semen congelado utilizado</u> .....	41
2.2.5. <u>Toma de muestras y registros</u> .....	41
2.2.6. <u>Mediciones realizadas en los animales</u> .....	42
2.3. <b>Análisis estadístico</b> .....	43
2.3.1. <u>Penetración cervical y penetrabilidad del moco cervical en ovejas multíparas merino australiano</u> .....	43
2.3.2. <u>Penetración cervical, concentración de prostaglandina E<sub>2</sub> en moco cervical, fertilidad y prolificidad en ovejas nulíparas, primíparas y multíparas merino dohne</u> .....	43
3. <b>Resultados</b> .....	45
3.1. <b>Penetración cervical y penetrabilidad espermática del moco cervical en ovejas multíparas merino australiano</b> .....	45
3.1.1. <u>Penetración cervical</u> .....	45
3.1.2. <u>Perfil de E<sub>2</sub> y de P<sub>4</sub></u> .....	46
3.1.3. <u>Expresión de estro</u> .....	48
3.1.4. <u>Penetrabilidad espermática del moco cervical</u> .....	51
3.1.5. <u>Tasa ovulatoria potencial y tasa ovulatoria</u> .....	52
3.2. <b>Penetración cervical, concentración de prostaglandina E<sub>2</sub> en moco cervical, fertilidad y prolificidad en ovejas nulíparas, primíparas y multíparas merino dohne</b> .....	53
3.2.1. <u>Penetración cervical</u> .....	53
3.2.2. <u>Análisis de prostaglandina E<sub>2</sub> en moco cervical</u> .....	56
3.2.3. <u>Fertilidad y prolificidad</u> .....	56
4. <b>Discusión</b> .....	60
4.1. <b>Hipótesis</b> .....	60
4.2. <b>Merino australiano</b> .....	60
4.3. <b>Merino dohne</b> .....	63

4.4. <b>Discusión general</b> .....	65
5. <b>Conclusiones</b> .....	69
6. <b>Bibliografía</b> .....	70
7. <b>Anexos</b> .....	84
7.1. <b>Administration of carbetocin prior to fixed-time artificial insemination increases cervical penetration and prolificacy but not fertility when frozen-thawed semen is deposited via the cervix in ewes</b> .....	84
7.1.1. <b>Abstract</b> .....	85
7.1.2. <b>Introduction</b> .....	86
7.1.3. <b>Materials and methods</b> .....	88
7.1.4. <b>Statistical analysis</b> .....	92
7.1.5. <b>Results</b> .....	93
7.1.6. <b>Discussion</b> .....	98
7.1.7. <b>Conclusions</b> .....	100
7.1.8. <b>References</b> .....	101

## Resumen

El cérvix ovino impide que el semen congelado-descongelado (CD) sea depositado en el cuerpo del útero durante una IA intracervical (IC), lo que perjudica la fertilidad. La fertilidad de la IA IC con semen CD mejora con deposiciones profundas en el cérvix o en el cuerpo uterino; sin embargo, existen diferencias entre razas y paridad. La oxitocina mejora la penetración cervical (PC) y la prolificidad, pero se requiere un procedimiento complejo. La hipótesis de este estudio es que el tratamiento con carbetocina (Cb), un análogo de la oxitocina, 12 horas antes de la IA IC permitiría incrementar la PC, fertilidad y prolificidad en ovejas nulíparas, primíparas y multíparas de la raza merino australiano (MA) y merino dohne (MD). Se compararon la PC y la penetrabilidad espermática (PE) del moco cervical colectado durante el estro de 30 ovejas MA. Se comparó IA intrauterina (IU) con IA IC en 400 ovejas MD nulíparas, primíparas y multíparas, con ciclos estrales sincronizados. Se midió la PC durante la IA a tiempo fijo (IATF) en el grupo inseminado IC (n = 200). Se observó una tendencia (P = 0,08) en la PE entre los mocos colectados a las 48 y 54 horas y se registraron penetrabilidades de  $19,42 \pm 2,34$  en relación con  $12,8 \pm 2,34$  mm para las 48 y 54 horas, respectivamente. La PC mejoró con la Cb en las tres categorías de parto en la raza MD, no en la MA. La PC fue más profunda en multíparas que en nulíparas o primíparas. La fertilidad fue mayor con la IA IU (64,1 %) que con la IA IC (19,9 %; P = 0,0001). Ni la Cb ni la paridad afectaron la fertilidad. Sin embargo, la prolificidad fue superior en un 15,2 % con la IA IU en comparación con la IA IC (P = 0,0346). La Cb incrementó la prolificidad (P = 0,0090), superó en 18,7 % la prolificidad en relación con el control. Concluyendo, la Cb aumentó la PC, sin beneficios para la fertilidad, con la IA IC. Por el contrario, en la IA IU, los efectos de la Cb se asociaron con la prolificidad.

**Palabras clave:** *Ovis aries*, cérvix; moco vaginal, fertilidad, prolificidad, eCG

## Summary

### **Intracervical insemination with frozen-thawed semen in ewes with carbetocin: cervical penetration, fertility and prolificacy in Australian Merino and Dohne sheep**

The ovine cervix prevents frozen-thawed (FT) semen from being deposited in the body of the uterus during an intracervical AI (IC), thus impairing fertility. The fertility of IC AI with FT semen improves with deep semen deposition in the cervix or uterine body; however, there are differences between breeds and parity. Oxytocin improves cervical penetration (CP) and prolificacy, but a complex procedure is required. The hypothesis of this study is that treatment with carbetocin (Cb), an analogue of oxytocin, 12 hours before IC AI would increase PC, fertility and prolificacy in nulliparous, primiparous and multiparous ewes of the Australian merino breed (MA) and merino dohne (MD). CP and sperm penetrability (PE) of cervical mucus collected during estrus from 30 MA ewes were compared. Intrauterine (IU) AI was compared with IC AI in 400 nulliparous, primiparous and multiparous MD ewes, with synchronized estrous cycles. CP was measured during AI TF in the IC inseminated group (n = 200). A trend (P = 0.08) was observed in PE between the mucus collected at 48 and 54 hours, registering penetrability of  $19.42 \pm 2.34$  in relation to  $12.8 \pm 2.34$  mm for 48 and 54 hours, respectively. CP improved with Cb in the three parity categories in the MD breed, but not in the MA. CP was deeper in multiparous than in nulliparous or primiparous. Fertility was higher with IU AI (64.1%) than with IC AI (19.9 %; P = 0.0001). Neither Cb nor parity affected fertility. However, prolificacy was 15.2 % higher with IU AI compared to IC AI (P = 0.0346). Cb increased prolificacy (P = 0.0090), exceeding prolificacy by 18.7 % in relation to the control. Concluding, Cb increased CP, without benefits for fertility, with IC AI In contrast, in IU AI, the effects of Cb were associated with prolificacy.

**Keywords:** *Ovis aries*, cervix, vaginal mucus, fertility, prolificacy, eCG

## 1. Introducción

El rubro ovino en el Uruguay explicó un 3,1 % del total de las exportaciones del Uruguay (DIEA, 2022), se desarrolla en todo el territorio nacional e involucra un número importante de productores. Hay 40.000 productores ganaderos que tienen a los ovinos como 1 de sus 3 rubros principales (DIEA, 2019). La población ovina es de 6.164.985 millones, el 63,4 % de las existencias se encuentran en los departamentos de Salto, Artigas, Paysandú, Tacuarembó y Durazno (DIEA, 2022). La producción ovina desempeña un papel importante en Uruguay, y si bien se desarrolla en todo el territorio nacional, la zona norte del país es donde se concentra el mayor número de ovinos.

Pese a la importancia histórica del rubro, la población ovina está en su mínimo histórico, siendo crítico el uso de tecnologías que permitan incrementar el uso de los mejores recursos genéticos existentes. En este sentido, la inseminación artificial (IA) en ovinos es una biotecnología beneficiosa para los productores: permite disminuir el número de carneros en los servicios, incrementar el diferencial de selección y evitar la transmisión de enfermedades reproductivas y contagiosas (Azzarini, 1992). Se potencia cuando se realiza con semen congelado por facilitar la disponibilidad de dosis de semen más allá de barreras geográficas y temporales (Salamon y Maxwell, 1995a). Un porcentaje alto de productores conoce la técnica, pero no la aplica en sus sistemas de producción (Gómez y Ferreira, 2011). Solo el 1 % de los 41.570 establecimientos ganaderos practicó la IA y solo el 8,5 % de las ovejas de cría fueron inseminadas anualmente (DIEA, 2015). Las ventajas de la IA con semen congelado son conocidas, pero por algunos motivos esta tecnología no es adoptada masivamente.

Es posible lograr una buena fertilidad con IA por vía intracervical (IC) utilizando semen fresco (Maxwell y Watson, 1996), minimizando labores y mejorando el bienestar animal (Tervit et al., 1984). La IA cervical es una de las técnicas más utilizadas en ovinos, debido a lo sencillo que resulta el procedimiento y su fácil implementación en comparación con la técnica intrauterina (IU) por laparoscopia (Maxwell y Hewitt, 1986). La IA cervical o vaginal con semen congelado en la mayoría de los reportes no logra igualar la fertilidad obtenida con la IA IU. Los resultados con semen congelado en IA cervical en ovinos son poco auspiciosos (Evans, 1988; Halbert et al., 1990a; Tervit et al., 1984). La fertilidad de una IA cervical en ovinos mejora cuando el semen congelado es depositado en el cérvix en lugar de en la vagina, incrementa si se logra una deposición más profunda dentro del cérvix ovino, pudiendo aumentar entre 7 y 12 % por cada centímetro que se incrementa la penetración (Eppleston et al., 1994; Salamon y Maxwell, 2000). Existen características del semen congelado que podrían explicar en parte los pobres resultados obtenidos en fertilidad con IA cervicales. Un 40 y 60 % de los espermatozoides mantiene su motilidad luego de ser descongelado; sin embargo, no pasa lo mismo con la longevidad, la capacidad de penetración del cérvix y de acceso al sitio de fecundación, como sí lo hace el semen fresco (Salamon y Maxwell, 1995b). El cérvix de la oveja dificulta el abordaje instrumental del cuerpo del útero por la vía cervical en condiciones normales; presenta una pequeña luz, anillos excéntricos, es rígido y poco permeable (Halbert et al., 1990c; Moré, 1984). Existen diferencias en el largo, el diámetro del canal interno y la penetración cervical obtenida con una cánula en borregas y ovejas adultas (Eppleston et al., 1994). Por lo tanto, en términos generales, los mejores resultados en fertilidad con semen congelado se logran con la IA IU por laparoscopia (Tervit et al., 1984). Considerada como una cirugía menor, la técnica IU laparoscópica requiere operarios calificados, mayor logística y equipamiento en comparación con la técnica IC, por lo que genera mayores costos (Casali et al., 2017). Es claro que en la IA IU por laparoscopia es ética la utilización de tratamientos

analgésicos que permitan a la oveja sobrellevar el procedimiento (Tervit et al., 1984). En la IA cervical, el animal no es sometido a maniobras dolorosas y cruentas, por lo que se recupera antes del estrés que le genera la IA IU por vía laparoscópica. En la actualidad, si se considera realizar una IA con semen congelado procurando buenos resultados, la recomendación técnica es recurrir al procedimiento IU por laparoscopia, dado que esta permite levantar efectos intrínsecos del semen congelado y las limitantes vinculadas a la anatomía del cérvix ovino, pero los costos asociados aumentan. El desafío es desarrollar una técnica que permita inseminar con semen congelado por la vía cervical profunda, que aumente la fertilidad y disminuya el costo, el dolor y el estrés de la oveja. Este trabajo procura contribuir a levantar las dificultades vinculadas a las características de cérvix ovino, permitiendo una mayor penetración cervical y la deposición más profunda del semen.

## **1.1. Anatomía del cérvix ovino**

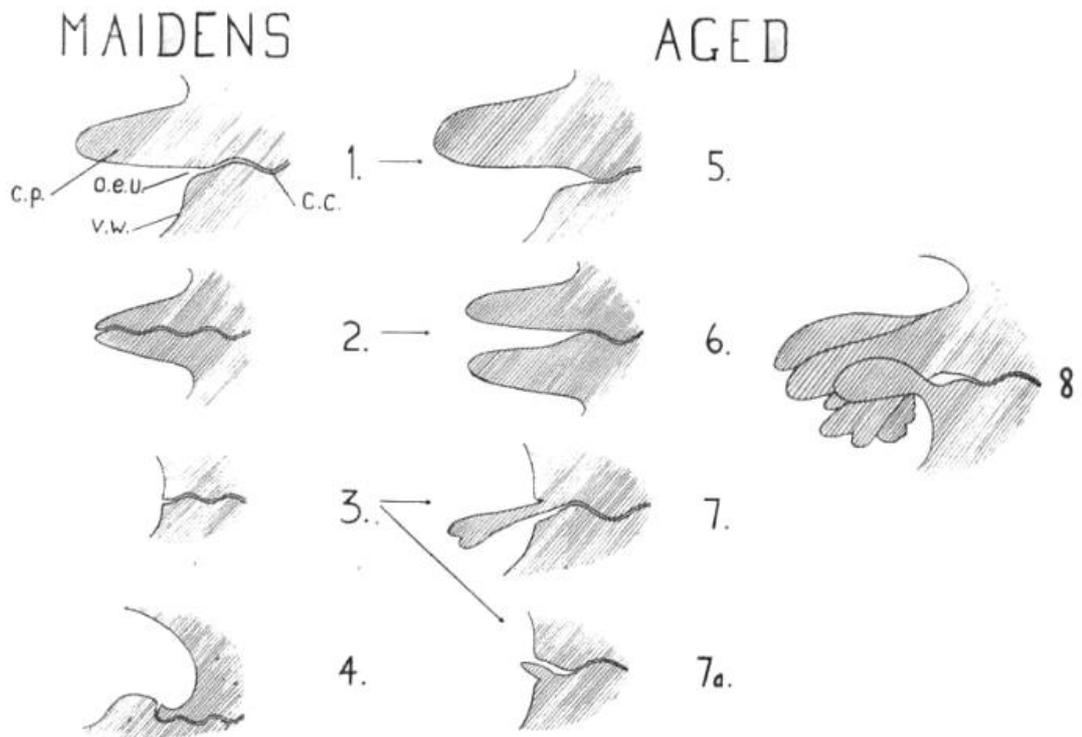
### **1.1.1. Anatomía descriptiva**

El cérvix ovino es una estructura compleja, presenta capas especializadas que cumplen diversas funciones y puede modificar su estructura durante el estro y el parto (Senger, 2003). En su conjunto, el cérvix ovino presenta una matriz compuesta principalmente de colágeno y glucosaminoglucanos. La anatomía del cérvix de la oveja presenta capas especializadas (Moré, 1984). La musculatura del cérvix puede dividirse en 2 capas, una interior compuesta por haces circulares y radiales y otra exterior compuesta por haces longitudinales. Los diferentes haces de músculo liso están incrustados con fibras de tejido conjuntivo denso (Moré, 1984). Hacia la luz, la mucosa forma pliegues que dan lugar a la formación de saco y anillos excéntricos, con forma de embudo con la base hacia craneal. El número de anillos (al igual que el grado de desarrollo) puede variar de acuerdo a la raza y con la edad de los animales, pudiendo presentarse de desde 3 hasta 8 anillos

(Figueira et al., 2020; Halbert et al., 1990c). El segundo anillo es excéntrico, por lo que generalmente representa el mayor obstáculo para la inserción del instrumental a través del cuello uterino de la oveja (Álvarez et al., 2012; Kaabi et al., 2006). El número de anillos ha sido considerado normalmente como uno de los aspectos para tener en cuenta para evaluar el grado de dificultad que puede tener penetrar el cérvix y alcanzar el cuerpo del útero; sin embargo, puede depender más del grado de desalineamiento que estos presenten entre sí que del número en sí mismo (Figueira et al., 2020). Se han realizado clasificaciones del cérvix ovino con base en la presencia de papilas en el orificio de ingreso o primer anillo (figura 1); el grado de dificultad para ingresar en el cérvix aumenta frente a un mayor número de papilas (Dun, 1955). Las diferencias en tamaño, número de anillos y la presencia de capas musculares especializadas hacen del cérvix de la oveja una estructura compleja.

**Figura 1**

*Esquema de clasificación del cérvix ovino.*



*Nota.* Tomado de Dun (1955).

### 1.1.2. Influencia de la raza y la edad de los ovinos

La raza de la oveja es un factor que influye en la penetración cervical que se puede lograr (Kaabi et al., 2006). En términos generales, las razas carniceras y de pelo permiten mayores penetraciones cervicales en comparación con las registradas en ovejas de biotipos laneros (Álvarez et al., 2012; Falchi et al., 2012). El porcentaje de preñez obtenido en la raza assaf fue superior (39,3 % y 49,5 %) comparado con la raza churra (29,0 % y 39,0 %), para los catéteres IMV y CAT06, respectivamente (Álvarez et al., 2012). En ovejas suffolk y belclare se encontraron diferencias en los porcentajes de preñez luego de realizar una IA cervical utilizando semen congelado (Richarson et al., 2011). Por otra parte, la penetración cervical en ovejas vendéenne (30 mm) fue significativamente menor que en las razas ile de france (35,5 mm) y romanov (35 mm) (Falchi et al., 2012). En todas las razas de ovejas utilizadas, la profundidad de penetración cervical durante el estro aumentó hasta las 54 horas posteriores al retiro de las esponjas (Casuriaga et al., 2019; Falchi et al., 2012).

La edad de las ovejas puede condicionar la penetración cervical, y existe un mayor grado de dificultad en encontrar el orificio cervical en ovejas multíparas debido al mayor número de papilas que estas presentan en comparación con ovejas primíparas o borregas (Dun, 1955). Sin embargo, una vez ingresado en el cérvix, resulta más fácil la penetración en ovejas adultas que animales jóvenes; la penetración cervical media obtenida en ovejas merino australiano se incrementó en la medida que aumentó la edad de 4 a 7 años (Eppleston et al., 1994). En ovejas nulíparas la penetración cervical utilizando una cánula de IA resultó casi imposible (Fukui y Roberts, 1978). Esto puede ser explicado con base en las diferencias anatómicas encontradas en cérvix de ovejas de 2 años en comparación con las de más de 3 años; las primeras presentaron cérvix más cortos, estrechos y con un mayor número de sacos cervicales en comparación con las ovejas de 3 años

(Kaabi et al., 2006). En términos generales, las ovejas nulíparas (corderas) presentan un cérvix de menor peso, largo, diámetro de la luz cervical y tortuosidad en comparación con las ovejas multíparas (Naqvi et al., 2005). La penetración cervical de órganos reproductivos de ovejas y corderas provenientes de frigoríficos difiere según se encuentran en fase luteal o folicular. La penetración cervical en fase folicular fue mayor frente a la fase luteal. Las penetraciones cervicales obtenidas en corderas fueron de  $15,7 \pm 1,41$  vs.  $10,5 \pm 1,58$  mm (fase folicular y luteal, respectivamente) y en ovejas fueron de  $15,9 \pm 3,35$  vs.  $11,8 \pm 0,56$  mm (fase folicular y luteal, respectivamente) (Kershaw et al., 2005). Las diferencias que presenta la anatomía de las corderas (figura 2) y las ovejas (figura 3) principalmente radican en el diámetro y largo que presenta el cérvix: en términos generales, las corderas presentan menor largo y diámetro que las ovejas (tabla 1).

## Figura 2

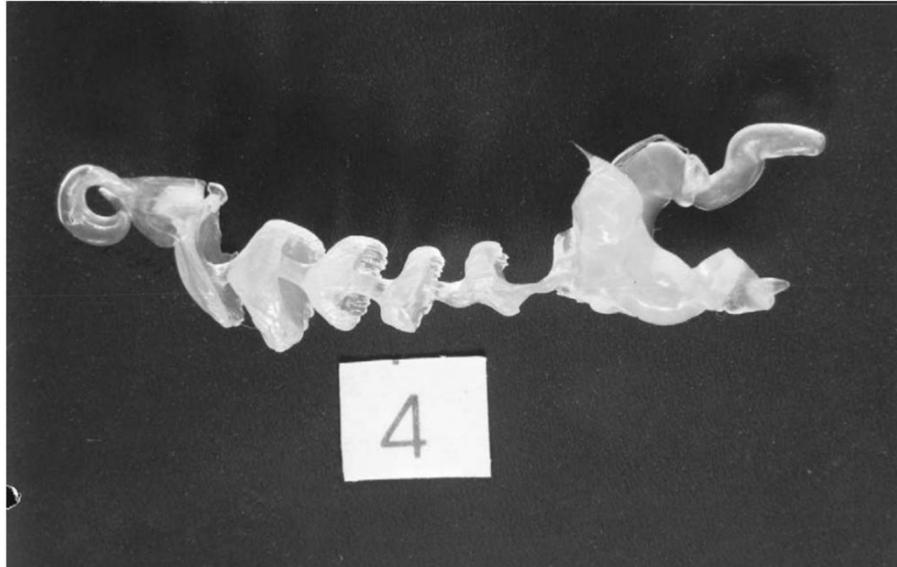
*Imagen de un molde de silicona del canal del cérvix de una cordera.*



*Nota.* Tomado Naqvi et al. (2005).

**Figura 3**

*Imagen de un molde de silicona del canal del cérvix de una oveja adulta.*



*Nota.* Tomado de Naqvi et al. (2005).

**Tabla 1**

*Caracterización del cérvix ovino: largo del cérvix ovino (cm), número de anillos o sacos según raza, categoría, y el número de animales evaluados según varios autores.*

Raza	N	Categoría	Largo del cérvix (cm)	Número de anillos/sacos	Referencia
Suffolk	53	Ovejas	6,6 ± 1,1	4,8 ± 1,0	Halbert et al., 1990c
Cheviot	8	Ovejas	7,3 ± 0,6	5,6 ± 0,5	Halbert et al., 1990c
Merino	30	Nulíparas 18 meses	3,69 ± 0,11	4,21 ± 0,13	Eppleston et al., 1994
Merino	30	Mutíparas 4 a 7 años	4,87 ± 0,10	3,97 ± 0,13	Eppleston et al., 1994
Malpura y Kheri	25	Corderas	3,87 ± 0,12	3,24 ± 0,19	Naqvi et al., 2005
Malpura y Kheri	25	Adultas	5,36 ± 0,15	3,48 ± 0,20	Naqvi et al., 2005
Cruzas	29 7	Adultas y jóvenes	5,35 ± 0,10	4,89 ± 0,06	Kershaw et al., 2005
Lacaune	24	15-93 meses		6,0 ± 0,1 Rango (5 a 8)	Figueira et al., 2020

## 1.2. Fisiología del cérvix

### 1.2.1. Ciclo estral de la oveja

El ovino es una especie poliéstrica estacional (Short, 1984), relacionado con la estación de partos más propicia para la sobrevivencia de las crías, y guarda relación con el lugar en donde es originaria la raza. La raza merino australiano es la que presenta una estación de cría más larga (Goodman e Inskeep, 2015) y en el hemisferio sur (Uruguay) va desde noviembre hasta mayo (Fernández-Abella et al., 1996). El ciclo estral del ovino tiene una duración de  $17 \pm 2$  días y puede dividirse en una fase folicular de 2 a 3 días y una fase luteal de 13 a 14 días, dependiendo de las hormonas y estructura que predominen en el ovario (Goodman e Inskeep, 2015). La fase luteal es caracterizada por la presencia de niveles crecientes o altos de progesterona (P4), producto de un cuerpo lúteo en formación o funcional (Hansel et al., 1973). En la fase folicular existe predominio de folículos, los cuales producen  $17\beta$  estradiol (E2), durante el reclutamiento folicular; su desarrollo es estimulado por la acción de la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) producidas y liberadas por la glándula hipofisaria: ambas son estimuladas por la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), producida y liberada por el hipotálamo (Karsch, 1984). Los bajos niveles de P4, característicos en la fase folicular (Sheldrick y Flint, 1985), hacen que el E2 provoque una retroalimentación positiva en el hipotálamo sobre la liberación de GnRH, y una retroalimentación negativa en la adenohipofisis sobre FSH (Karsch, 1984). Los ovarios de las ovejas tienen una reserva potencial de folículos primordiales entre 12.000 y 86.000, entre 100 y 400 folículos en crecimiento, de los cuales de 10 a 40 son visibles en la superficie ovárica, esto puede variar de acuerdo con la raza (Rubianes, 2000). Los folículos primordiales crecen en ondas; en el ovino pueden darse de 2 a 5 ondas foliculares en un ciclo estral. El comportamiento predominante es el desarrollo de 2 o 3 ondas (Evans et al., 2000). Cuando

las ovejas presentan condición corporal alta, se desarrollan 3 ondas que emergen los días 0, 6 y 11 (Viñoles et al., 2002). El desarrollo de cada onda es observado posteriormente a un aumento en la concentración de FSH, la cual disminuye luego de que un folículo adquiriera un diámetro máximo mayor o igual a los 5 mm para cada onda folicular (Viñoles et al., 2002). Como consecuencia del desarrollo de los folículos, los niveles de E2 en sangre aumentan (Baird, 1984). Se ha observado que el folículo de mayor diámetro es capaz de producir más E2 que lo producido por el conjunto de los folículos de menor tamaño en de una misma onda (Evans et al., 2000). El crecimiento de los folículos dentro de una onda se encuentra regulado; existe una dominancia de los folículos de mayor diámetro sobre los de menor diámetro (Driancourt, 2001; Evans et al., 2000; Scaramuzzi et al., 2011). La secreción de FSH es controlada por una retroalimentación negativa en la glándula hipofisaria por la inhibina secretada por los folículos dominantes y el E2 (Scaramuzzi et al., 2011). La sustitución de receptores de FSH por receptores de LH en las células de la granulosa condicionan el número de folículos que continúan con su desarrollo hasta lograr la ovulación, algunas horas posteriores al pico de LH (Campbell et al., 1999). Una alta concentración de E2 y baja de P4 es necesaria para que la última onda termine generando 1 o más folículos maduros que logren ovular posterior al pico de LH.

### 1.2.2. Etapas del ciclo estral ovino

#### 1.2.2.1. Proestro

La etapa del proestro tiene una duración de 3 días y, dado que por convención se asigna el inicio del estro al día 0 del ciclo estral, diremos que el proestro va desde el día -3 hasta al día 0. Es una etapa donde los niveles de P4 disminuyen en sangre producto de la lisis del cuerpo lúteo por la prostaglandina F2 alfa ( $PGF_2\alpha$ ) secretada por el endometrio a partir del día 14 del ciclo (Flint et al., 1994). Esto desencadena un aumento de la

secreción de GnRH por el hipotálamo, lo que estimula la producción y liberación de FSH y LH desde la hipófisis. El efecto de la FSH estimula el desarrollo de los folículos del ovario, lo que aumenta los niveles de E2 en sangre. Los niveles más altos de FSH se alcanzarían en el entorno de las 12 horas antes del inicio del estro, disminuyen posteriormente (Hansel et al., 1973). Esta disminución está asociada a la retroalimentación negativa que los altos niveles de E2 e inhibina generan sobre la producción de FSH en la adenohipófisis (Karsch, 1984).

#### 1.2.2.2. Estro

El estro es el momento donde la hembra acepta la monta del macho (Short, 1984). En términos generales su duración oscila entre 24 y 36 horas en razas laneras; en razas prolíficas se incrementa hasta las 51 horas en promedio (Land, 1970). Las ovejas en estro pueden presentar secreciones mucosas en la vulva, que provienen del cérvix (Restall, 1966). En esta etapa se presenta una alta concentración de E2 producto del desarrollo folicular debido al incremento en las concentraciones de FSH registrado en el proestro (Karsch, 1984). Existen cambios en los receptores a FSH y LH en los folículos, los folículos dominantes desarrollan antes receptores a LH en las células de la granulosa y estos folículos pueden continuar su desarrollo en ausencia total de la FSH (Campbell et al., 1999). Los folículos dominantes secretan inhibina, hormona que por retroalimentación negativa inhibe a la producción de FSH en la hipófisis, lo que provoca la atresia de todos los folículos que no hayan adquirido los receptores a LH (Driancourt, 2001). La retroalimentación positiva de los estrógenos en hipotálamo sobre la GnRH desencadena una liberación masiva de LH. El pico de LH puede registrarse entre las 5 y 12 horas de iniciado el estro (Hansel et al., 1973). Es necesario que se dé el pico de LH para que desencadene la ovulación de los folículos dominantes, esto ocurre a las 24-30 horas de iniciado el estro (Goodman e Inskeep, 2015). Al sincronizar el estro en la raza merino

australiano, un 85-95 % de las ovejas manifestó estro entre 36 y 60 horas después de retirar la esponja con acetato de medroxiprogesterona (MAP) y aplicar 200 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG), y la mayor concentración de estro se alcanzó entre las 36 y 48 horas posterior al fin del tratamiento con progestágenos (revisado por Gibbons et al., 2019). Ovejas merino australiano adultas iniciaron estro en promedio a las 43,2 horas luego del retiro de esponjas con progestágenos (12 días) y 400 UI de eCG, con un rango de 30 a 46 horas (Maxwell, 1986). Se observó que con 6 días de esponjas impregnadas con MAP y 380 UI de eCG im al retiro de estas se logró que el 94,1 % de las ovejas manifestaran estro y se obtuvo un promedio de  $44,6 \pm 1,7$  horas para el inicio pos-eCG (Ungerfeld y Rubianes, 2002). Cuando se inyectaron 2 dosis de  $\text{PGF}_2\alpha$  separadas en 10 días, se observó que el promedio de inicio del estro posretiro de esponja fue de  $50,0 \pm 6,00$  horas (Fierro et al., 2016). En trabajos donde las dosis se separaron 7 o 15 días, se observó que el 78,8 % y el 91,6 % de las ovejas iniciaron el estro entre las 24 y 48 horas (Menchaca et al., 2004) o entre las 24 y 72 horas post segunda dosis respectivamente (Olivera-Muzante et al., 2020). La ovulación en ovejas sincronizadas tuvo lugar desde las 54 hasta las 75 horas posteriores al retiro de esponjas e inyección de eCG (Walker et al., 1989).

#### 1.2.2.3. Metaestro

La etapa del metaestro tiene lugar posterior a la ovulación, correspondiendo con el día 1 del ciclo hasta el día 4 con la presencia de un cuerpo hemorrágico que se transforma en cuerpo lúteo funcional con la capacidad de producir  $\text{P}_4$  (Goodman e Inskeep, 2015). Luego de la ovulación, en donde estaba el folículo existe una invasión de pequeños vasos sanguíneos que dan lugar a la formación del cuerpo hemorrágico. Durante esta etapa, las células de la granulosa y de la teca que integraban el folículo pasan a formar una estructura muy vascularizada que presenta una pequeña cavidad;

esta adquiere la capacidad de producir P4, y aumenta paulatinamente la secreción desde la ovulación (Baird, 1984). El número de cuerpos lúteos está estrechamente ligado al número de folículos que hayan ovulado. En la especie ovina la tasa ovulatoria (TO) puede variar con la raza, la estación del año (Fernández-Abella et al., 1996), la nutrición (Martin et al., 2004) y el temperamento (Van Lier et al., 2017).

#### 1.2.2.4. Diestro

El diestro es la etapa más larga del ciclo estral, tiene lugar desde el día 3 (Rubianes et al., 2003) hasta el día 14 del ciclo cuando por la acción de la  $PGF_2\alpha$  se provoca la lisis del cuerpo lúteo (Goodman e Inskeep, 2015). La P4 producida por el cuerpo lúteo causa un bloqueo en el hipotálamo, disminuye la amplitud y la frecuencia de la liberación de GnRH (Karsch, 1984); al mismo tiempo reduce el número de receptores de GnRH en la adenohipófisis (Karsch, 1984), lo que impide que se desencadene el pico preovulatorio de LH. La P4 inhibe la contractilidad del miometrio uterino y reduce el tono de este órgano (Heap y Flint, 1984). Si tiene lugar la fecundación, el embrión en su estado libre previo a la implantación produce una proteína específica que da la señal que impide la luteólisis. Esta proteína se llama interferón tau, actúa sobre las células del endometrio uterino inhibiendo la producción de receptores a oxitocina (ROx), por lo que la oxitocina (Ox) liberada por el cuerpo lúteo no encuentra a su receptor en el endometrio uterino lo que evita que se produzca la liberación de  $PGF_2\alpha$  (Flint et al., 1994). El proceso de la luteólisis está controlado por la acción de las hormonas Ox y P4, que son producidas por el cuerpo lúteo, y por la acción de la  $PGF_2\alpha$ , producida por el endometrio uterino (Baird, 1984). El mecanismo por el cual la  $PGF_2\alpha$  producida en el endometrio uterino llega al ovario involucra un proceso particular conocido como de difusión a contracorriente. La  $PGF_2\alpha$  pasa desde la vena uterina a la arteria ovárica evitándose el pasaje a través de los pulmones, lo cual inactivaría la hormona.

Este mecanismo asegura altas concentraciones de la  $\text{PGF}_2\alpha$  en su órgano blanco. La secreción de  $\text{PGF}_2\alpha$  ocurre en pulsos y son necesarios varios pulsos de Ox para que se libere la  $\text{PGF}_2\alpha$ . Se estima que se necesitan 24 horas para lograr la luteólisis total (Baird, 1984).

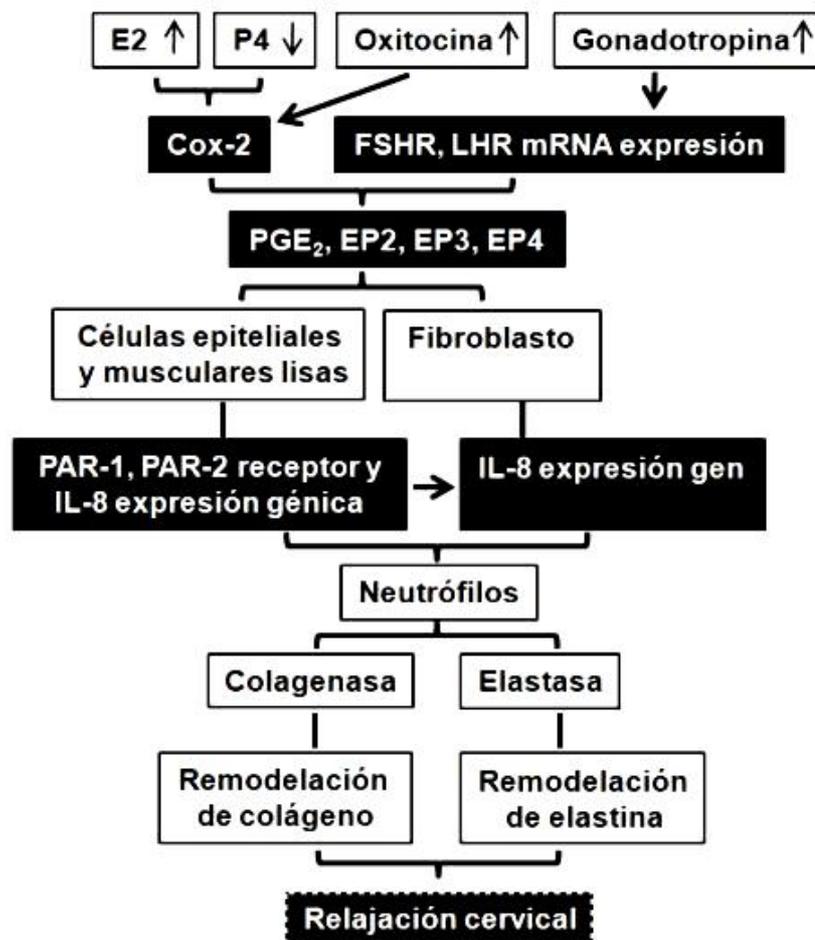
### 1.2.3. Hormonas asociadas al ciclo estral ovino y la dilación cervical

Las funciones del cérvix están reguladas por la acción conjunta de diferentes hormonas, receptores y sustancias involucradas en la regulación de la síntesis de prostaglandina  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ ). El  $\text{E}_2$  cumple un papel fundamental en la síntesis de los receptores a oxitocina (ROx) en la etapa del proestro y estro, el número de los ROx es alto en la etapa entorno al pico de LH, específicamente entre las 32 y 44 horas luego del retiro de las esponjas impregnadas con progestágenos colocadas durante 12 días y suministrar análogos de  $\text{PGF}_2\alpha$  (Falchi y Scaramuzzi, 2013). Es muy importante para que se desencadenen los procesos de producción de  $\text{PGE}_2$  que la relación  $\text{E}_2/\text{P}_4$  sea alta, ya que esto estimula la síntesis de los ROx (Rodríguez-Piñón, 2015). La oxitocina se une a su receptor de membrana y activa la proteína G, la cual genera un aumento en la concentración del calcio citoplasmático, lo que provoca un incremento en la actividad de la fosfolipasa citoplasmática  $\text{A}_2$  ( $\text{cPLA}_2$ ) (Zhang et al., 1996). El ácido araquidónico (AA) es 1 de los componentes de la membrana plasmática que pasa al estado libre por la acción de la  $\text{cPLA}_2$ . El AA es utilizado como sustrato por las ciclooxigenasas 1 y 2 (COX1 y COX2), las cuales lo transforman en prostaglandina  $\text{H}_2$  ( $\text{PGH}_2$ ). En el cérvix ovino la expresión de la COX-2 es mayor en la etapa previa al pico de LH que en la fase luteal (Falchi y Scaramuzzi, 2013). Posteriormente, la acción de  $\text{PGE}_2$  sintasa convierte la  $\text{PGH}_2$  a  $\text{PGE}_2$ , la  $\text{PGE}_2$  se uniría a sus receptores EP2 y EP4, ubicados en el músculo liso y los fibroblastos (Kershaw et al., 2010), lo que estimula la relajación del músculo liso y la producción de glucosaminoglucanos. El incremento de los glucosaminoglucanos en el

estroma sería responsable de generar la dispersión y separación de las fibras de colágeno, culminando con la dilatación cervical (Rodríguez-Piñón et al., 2015) (figura 4).

**Figura 4**

*Esquema del proceso de dilatación cervical en el ovino durante el estro y relación de las principales hormonas involucradas.*



*Nota.* Elaborado a partir de Robinson et al. (2011); Rodríguez-Piñón (2015); Rodríguez-Piñón et al. (2014).

#### 1.2.4. Características del moco cervical

En los rumiantes, durante la manifestación del estro puede observarse secreción mucosa en la vulva. Estas secreciones son producidas en el cérvix bajo la acción de hormonas esteroideas y presentan características y funciones particulares que están relacionados a la reproducción. Se ha descrito la presencia y el incremento continuo de receptores a estradiol en el cérvix y la porción craneal de la vagina desde la fase luteal hasta momentos posteriores al pico preovulatorio de LH durante el estro (Falchi y Scaramuzzi, 2013). El cérvix responde al E2 produciendo moco (Rexroad y Barb, 1977). Las principales funciones del moco son lubricar la vagina durante la cópula, minimizar la introducción de microorganismos al útero (Senger, 2003), y oficiar de medio por donde los espermatozoides serán depositados en el período preovulatorio y deberán viajar a través de este hacia el sitio de fecundación (Druart, 2012). El moco cervical juega un papel fundamental durante el transporte espermático en el estro (Rexroad y Barb, 1977). Las propiedades bioquímicas y físicas del moco cervical cambian durante el transcurso de esta etapa (Restall, 1966; Richardson et al., 2011). El moco de ovejas (estro natural) es más abundante durante la fase folicular, presenta un color más claro y menor contenido de proteína en comparación con el moco producido durante la fase lútea (Maddison et al., 2017). El moco cervical tiene una consistencia viscosa; entre un 85 % y un 95 % es agua, siendo los demás componentes iones (Na, Mg, Ca, K, Cl), proteínas, mucina e inmunoglobulinas (Alexander, 1981). En el moco cervical se han encontrado 689 metabolitos, de los cuales 458 se han visto alterados por la raza y 244 por efecto del tipo de celo (natural vs. sincronizado) (Abril-Parreño et al., 2023). El moco producido en estro natural presenta un pH entorno a la neutralidad ( $6,97 \pm 0,3$ ) y una osmolaridad de  $271,7 \pm 19,4$  Osm/L (Manes et al., 2016). Las características que presenta el moco cervical pueden verse modificadas a partir de la utilización de dispositivos intravaginales y hormonas empleadas durante los protocolos de

sincronización de estro en ovinos. En comparación con el moco producido durante el estro natural, la PGF2 $\alpha$  genera una disminución, mientras que la eCG y FSH provocan un incremento en la producción de moco cérvico vaginal (Maddison et al., 2017). La utilización de esponjas impregnadas con MAP colocadas durante 14 días en ovejas texel aumentó el pH ( $6,97 \pm 0,3$  vs.  $7,97 \pm 0,6$ ), la osmolaridad ( $271,7 \pm 19,4$  vs.  $303,4 \pm 8,5$  Osm/L) y el recuento bacteriano del moco vaginal colectado ( $6.84 \pm 1.6$  vs.  $7.81 \pm 0.69$  CFU/mL X  $10^3$ ) (Manes et al., 2016). El proceso de incubación espermática realizado sobre el moco cervical provocó una disminución en la motilidad progresiva y en el porcentaje de espermatozoides con la membrana intacta en relación con los espermatozoides que fueron incubados en moco colectado de celos sin sincronizar (Manes et al., 2016). Sin embargo, valores reportados en el pH del moco cervical en ovejas texel y berclare sincronizadas durante 12 días con MAP (esponjas similares a las mencionadas), colectado a las 42, 48, 57 y 65 horas desde el retiro de la esponja, mostraron valores similares durante el estro entorno a la neutralidad ( $7,0 \pm 0,1$ ) (Richardson et al., 2011). Estos valores se encuentran próximos a los reportados para los mocos de estro natural en el grupo control ( $6,97 \pm 0,3$ ) de Manes et al. (2016). No está claro en el trabajo de Richardson et al. (2011) si las esponjas utilizadas tuvieron algún tratamiento antibiótico que pueda haber impedido cambios en los resultados en las características del pH y en el desarrollo bacteriano. Por lo tanto, es posible concluir que el moco cervical cumple un papel importante en la reproducción: es el medio por el cual los espermatozoides viajan hacia el sitio de fecundación; las propiedades físicas y químicas del moco pueden cambiar con base en la acción de hormonas y procedimientos que se realizan durante los protocolos de inseminación, esto puede condicionar el desempeño de los espermatozoides y repercutir en la fertilidad.

### **1.3. Técnicas de inseminación artificial en ovinos con semen congelado**

#### **1.3.1. Intrauterina por vía laparoscópica**

La inseminación artificial intrauterina (IA IU) es una técnica en la que se utiliza un laparoscopio e instrumental específico para depositar el semen congelado-descongelado (Evans, 1988). Es considerada como un procedimiento quirúrgico de poca complejidad; sin embargo, es necesario inmovilizar la oveja para depositar el semen en los cuernos uterinos mediante un abordaje abdominal (Evans, 1988). Para lograrlo, se deben realizar 2 incisiones abdominales en la oveja con la ayuda de trocares y vainas metálicas; en una de estas se inyectará dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) para distender el abdomen y por el mismo orificio se introducirá el instrumental óptico y la fuente de luz. En la segunda incisión, se coloca en primer lugar un palpador (barrilla metálica) utilizado para ubicar y dejar en posición los cuernos uterinos; posteriormente se retira el palpador y se introduce el inyector con la dosis inseminante. Esta se reparte en partes iguales entre los 2 cuernos uterinos procurando mejores resultados (Maxwell y Hewitt, 1986). Para realizar este procedimiento, la oveja debe permanecer en posición dorsal decumbente, con sus 4 patas inmovilizadas sobre una camilla específicamente diseñada, en una inclinación de 40°, dejando la cabeza hacia abajo (Maxwell et al., 1984). Es una técnica realizada para utilizar de manera más eficiente el semen congelado, dado que los resultados reportados en fertilidad son mejores a los obtenidos con la técnica cervical (Evans, 1988; Maxwell et al., 1984; Maxwell y Hewitt, 1986; Smith et al., 1995; Tervit et al., 1984). La fertilidad obtenida en una IA con semen congelado utilizando la vía cervical y vaginal fue de 17 y 22 %, respectivamente (Tervit et al., 1984). La fertilidad obtenida en IA IU con semen congelado oscila entre 55,6 % (Maxwell y Hewitt, 1986) y 83 % (Tervit et al., 1984). Esta técnica se asocia a protocolos de sincronización de la ovulación que buscan disminuir costos concentrando el trabajo del inseminador en uno o pocos días, por lo que la IA IU muchas veces se

realiza a tiempo fijo (TF) (Menchaca y Rubianes, 2004). En el procedimiento de IA IU por laparoscopia se ha utilizado anestesia para atenuar el dolor asociado al procedimiento (Maxwell et al., 1984; Tervit et al., 1984). Este aspecto, sumado al manejo del laparoscopio que requiere que los operarios vinculados al procedimiento estén altamente calificados, aumenta la logística, el equipamiento y los costos asociados en comparación con la técnica IC (Casali et al., 2017). Con base en lo manifestado, la técnica IA IU permite obtener buenos resultados en la fertilidad con semen congelado; sin embargo, se incrementan la complejidad y los costos y existen aspectos de bienestar animal que deben ser atendidos que limitan la masificación.

### 1.3.2. Cervical e intracervical

La IA cervical o intracervical (IA IC) es un procedimiento no quirúrgico en el que mediante la utilización de un espéculo o vaginoscopio con luz incorporada se ingresa por la vagina divisando el cérvix y mediante una cánula o pistola de inseminar se realiza la deposición del semen lo más profunda posible en el orificio de entrada del cérvix. Una de las diferencias de esta técnica con la IA IU es que el animal no debe ser inmovilizado en una camilla, pudiendo ser inseminado de pie con una muy leve sujeción (Donovan et al., 2004), o en posición vertical suspendido por los cuartos traseros de las ovejas dejando a la vista la zona perianal, apoyando sobre una de las barandas de un tubo utilizado para dosificar ovejas (Eppleston et al., 1994). La técnica puede ser utilizada con semen fresco, reportándose una fertilidad obtenida por ultrasonografía a los 40 días entre 60 % (merino australiano, Maxwell y Hewitt, 1986) y 82 % (razas irlandesas y noruegas, Donovan et al., 2004). La técnica ha sido utilizada con semen fresco en protocolos de sincronización con 2 dosis PGF<sub>2</sub>α separadas durante 15 días, realizando IATF a las 56 horas posteriores a la segunda dosis, lográndose una concepción de 59,8 % (Olivera-Muzante et al., 2020). También ha sido utilizada con semen congelado, reportando resultados que generalmente no

superan el 25 % de fertilidad (Maxwell y Hewitt, 1986; Tervit et al., 1984). La fertilidad obtenida con semen congelado va desde 17 % trabajando con ovejas de carne (Tervit et al., 1984) hasta 18,4 % en ovejas merino australiano (Maxwell y Hewitt, 1986) y 52 % en ovejas de razas de origen irlandés y noruego (Donovan et al., 2004). La excepción a la regla de la baja fertilidad obtenida parece ser algunas de las razas ovinas presentes en Noruega: el porcentaje de no retorno al estro promedio de 3000 a 3600 ovejas inseminadas en 5 años por vía IC con semen congelado fue de 59,3 % (Olesen, 1993; Paulenz et al., 2005 y Paulenz et al., 2007), valores muy buenos, similares a los reportados en algunas de las IA IU con semen congelado. Sin embargo, se ha observado que la fertilidad obtenida en IA IC mejora cuando el semen congelado se logra depositar más profundo en el cérvix ovino (Casali et al., 2017; Eppleston et al., 1994).

### 1.3.3. Técnica de Guelph

El método de IA transcervical de la Universidad de Guelph (Canadá) permite ingresar al cuerpo del útero con base en la fijación del cérvix ovino con la ayuda de pinzas que permiten retraerlo hacia la parte externa de la vagina (Halbert et al., 1990b). Se evaluaron diferentes mecanismos de sujeción de cérvix que incluían pinzas para retraer el cérvix y espéculos y cánulas para IA de ovejas, con el objetivo de dilatar de manera forzada la vagina, divisar el cuello del útero y retraerlo hacia caudal sin salir de la vagina con la ayuda de las pinzas y proceder a penetrar el cérvix con la cánula de inseminar seleccionada. Con esta técnica se obtienen resultados exitosos, sin embargo, ha sido cuestionada por comprometer el bienestar animal. La agresividad e intensidad de la técnica puede provocar traumatismos en el canal cervical, por esta razón, se consideran en futuros estudios los efectos negativos de la manipulación cervical mecánica.

El método Guelph formó parte de un experimento donde se compararon 3 técnicas de IA: (a) cervical con semen enfriado (IAC), (b) intrauterina por vía laparoscópica con semen congelado (IAL) y (c) transcervical con semen congelado (IAT Guelph), empleándose pajuelas con la misma concentración de espermatozoides (IAL y IAT Guelph) en ovejas ideal, romney y cruza dorset por romney (Smith et al., 1995). La IAT Guelph requirió mayor esfuerzo, trabajo, tiempo y habilidad del operario que la IAL; a su vez, la fertilidad promedio obtenida con la técnica IAT Guelph (34 %) fue menor para las 3 fechas de servicio y biotipos utilizados en comparación con la IAC (50,4 %) y la IAL (57,2 %). En la técnica de Guelph, se destaca lo laborioso y cruento que resultan dilatar de forma física el cérvix ovino cuando se quiere abordar el útero con la cánula durante la inseminación. Las pinzas utilizadas para retraer el cérvix perforaron el tejido uterino y causaron hemorragias, siendo necesario mucho tiempo para penetrar en el cuello uterino. Durante el experimento murieron 4 ovejas y a una se le perforó el canal cervical durante la maniobra. Existen dificultades adicionales como la localización de la abertura cervical y la fuerza necesaria para retraer el cuello uterino utilizando las pinzas. La agresividad de la técnica puede provocar traumatismos en el canal cervical (Halbert et al., 1990b).

#### **1.4. Características del semen congelado que condicionan la fertilidad obtenida**

Es posible mejorar los resultados de IA IC con semen congelado si se mejoran los procesos involucrados durante la congelación y la descongelación del semen (Maxwell y Watson, 1996). La capacidad de fertilizar de los espermatozoides luego del proceso de congelado y descongelado normalmente es la mitad de lo que tienen los espermatozoides presentes en el semen fresco (Salamon y Maxwell, 1995b). Esto puede ser mejorado en toros con base en protocolos de descongelación de las pajuelas que duren 12 segundos a 75 °C del agua en

lugar de 30 segundos a 35 °C del agua (Aamdal y Andersen, 1968). En carneros, descongelar las pajuelas a 70 °C durante 5 segundos generó una mayor motilidad e integridad de la membrana espermática que descongelar a las 35 °C durante 12 segundos (Söderquist et al., 1997). La penetración espermática en el moco cervical durante el estro está correlacionada de manera positiva con la motilidad espermática y la integridad del acrosoma de los espermatozoides pos descongelación. La correlación para penetración del moco cervical y motilidad fue igual a 0,89 ( $P < 0,001$ ), la correlación entre penetración cervical e integridad del acrosoma fue igual a 0,94 ( $P < 0,001$ ) (Anilkumar et al., 2001). El porcentaje de espermatozoides anormales estuvo correlacionado negativamente con la penetración espermática del moco cervical ( $r = -0,83$ ;  $P < 0,001$ ) (Anilkumar et al., 2001). Por lo tanto, ajustar las condiciones durante el proceso de descongelado puede mejorar aspectos directamente vinculados a la fertilidad.

## **1.5. Métodos para mejorar la penetrabilidad cervical en ovinos**

### **1.5.1. Modificaciones en los instrumentos utilizados durante la inseminación**

Se han realizado diferentes estudios del cérvix ovino con el objetivo de producir cánulas de IA que permitan adaptarse a la anatomía del cérvix procurando un abordaje del útero por la vía cervical. Los trabajos realizados han diseñado cánulas en forma de zig zag: este diseño pretende copiar la sinuosidad que presenta la anatomía «normal» del cérvix ovino (Álvarez et al., 2012; Rodríguez et al., 2017). Esto parte de la base de que el operario podría abordar el cuerpo del útero mediante manipulación de la cánula. Las cánulas modernas, diseñadas contemplando la anatomía del cérvix ovino, pueden ser una de las alternativas para lograr una deposición del semen más profunda en el cérvix o en el cuerpo del útero.

### 1.5.2. Modificaciones de las técnicas de inseminación

Con el objetivo de desarrollar una nueva técnica de IA, en Fukui y Roberts (1978) se inyectó CO<sub>2</sub> en el cuello del cérvix de manera tal que este empujaba al semen a presión hacia el interior del cuello uterino. De una serie de 4 experimentos realizados, el porcentaje promedio de deposición exitosa para 3 sitios diferentes dentro del canal cervical fue 40,6 % a partir de 2 cm, 65,4 % a partir de 3 cm y 48,3 % a partir de 4 cm. Se concluyó que esta técnica podría tener una potencial utilidad para lograr una IA transcervical exitosa. Sin embargo, no se encontraron reportes de fertilidad con este método.

Se evaluó la incorporación de lidocaína al 2 % aplicada con espray en el cuello del útero y el método de Guelph (transcervical) en comparación con la técnica por vía cervical e intrauterina por vía laparoscópica. La fertilidad fue afectada por el tipo de técnica de inseminación utilizada y por el momento en que se aplicó cada técnica (Casali et al., 2017). El porcentaje de fertilidad fue de 42,3 % en el método transcervical y de 36,0 % y 50,2 % en los métodos cervical e intrauterino, respectivamente. En aquellas ovejas inseminadas más allá de 4 cm de profundidad en el cuello uterino, la fertilidad fue mayor (60,0 %) en comparación con la obtenida en las ovejas donde no fue posible penetrar más de 4 cm (35,1 %). Sin embargo, el número de ovejas en las que se penetró más de 4 cm no superó el 28,8 %, por lo que se concluye que hay aspectos a mejorar dado que se inseminaron menos ovejas por hora con el método transcervical en comparación con la técnica cervical y por laparoscopia.

Se ha considerado seleccionar animales que presenten cérvix más permeables, lo que junto con la ultrasonografía puede ser una alternativa para mejorar la penetración cervical. La ultrasonografía ha sido utilizada como una herramienta para estimar el número de anillos y el grado de

desalineación que estos presentan, lo que permitiría seleccionar ovejas que presenten menos dificultad durante la penetración. Esta técnica se ha utilizado por primera vez en programas de transferencia de embriones (Figueira et al., 2020). Esto tiene importancia dado que se determinó, con base en 4 intentos sucesivos, que la capacidad de penetración a través del cuello uterino en cada oveja tiene una repetibilidad del 74,5 % (Fukui y Roberts, 1978).

### 1.5.3. Tratamientos hormonales

Los experimentos que estudian la dinámica de los tratamientos hormonales predominan frente a otras líneas de investigación. Los investigadores adoptan como estrategias para lograr dilatar el cérvix ovino incidir sobre aquellas hormonas y sustancias que han sido identificadas en el proceso de dilatación cervical (Dos Santos et al., 2020; Fonseca et al., 2016). El mismo razonamiento es observado en los trabajos que buscan comprender cómo son los procesos involucrados en la dilatación del cérvix (Falchi y Scaramuzzi, 2013, 2015; Rodríguez-Piñón, 2015). En términos generales, las principales hormonas en el proceso son interleucina-8, ácido hialurónico, gonadotropinas, PGE<sub>2</sub> y oxitocina (figura 4).

Se utilizó una citoquinina con el objetivo de lograr la remodelación y dilatación del tejido cervical de ovejas multíparas cruzas rideau arcott x suffolk de 80 kg de peso vivo en los días del estro y el día 7 del diestro (Croy et al., 1999). La interleucina-8 (IL-8) es una citoquina identificada en los neutrófilos y es producida en abundancia por las células fagocíticas mononucleares. El experimento consistió en colocar supositorios impregnados de IL-8 en el interior de la vagina de las ovejas para luego estudiar sus efectos. El tratamiento con IL-8 no fue suficiente para dilatar el cuello uterino de las ovejas utilizando como único agente el supositorio vaginal.

Otra sustancia probada fue el ácido hialurónico (AH) (Perry et al., 2010), un glicosaminoglicano cuya concentración aumenta de manera natural en el cuello uterino durante el estro, lo que podría contribuir en la dilatación natural del cérvix. La aplicación cervical de 25 mg de AH permitió una deposición de semen más profunda en el cuello uterino, pero sin lograr un pasaje total de la cánula hacia el cuerpo uterino. En ovejas sincronizadas con esponjas impregnadas con progestágenos y 200 U.I. de eCG, la profundidad de la penetración cervical medida a las 54 horas posretiro de las esponjas se incrementó de 12,2 mm a 36,6 mm mediante el tratamiento con AH a las 50 horas posretiro de la esponja (Perry et al., 2010). Sin embargo, la fertilidad depende de muchos factores, por lo que es pertinente medir el efecto de este tratamiento en la motilidad uterina, el transporte espermático y en la fertilidad.

También se investigó el papel de las gonadotropinas en la función cervical. Para esto se determinó la expresión de la ciclooxigenasa-2 (COX<sub>2</sub>), el ARN mensajero de la COX<sub>2</sub> y la concentración de AH en el cuello uterino después de un tratamiento intracervical con FSH y LH (Leethongdee et al., 2016). A tales efectos, se usaron 18 ovejas welsh mountain similares en peso vivo, condición corporal y edad, y se realizaron 4 tratamientos. Ni la FSH ni la LH estimularon la COX<sub>2</sub> en el epitelio luminal, lo cual sugiere que, si bien FSH y LH tienen un papel en la dilatación cervical durante el estro de la oveja, no pueden por sí solas inducir la dilatación cervical completa. Se le atribuye un rol secundario a la FSH y la LH comparado con el rol que cumplen la Ox y el E2 (Leethongdee et al., 2016). Por otro lado, trabajando *in vitro*, la FSH aumentó los niveles de COX<sub>2</sub>, pero no se vio reflejado un aumento en la concentración de PGE<sub>2</sub> (Falchi y Scaramuzzi, 2015).

Es aceptado que la PGE<sub>2</sub> es una de las principales hormonas encargadas de provocar la dilatación cervical (Fuchs et al., 2002). Con la hipótesis de que el

uso de supositorios de liberación lenta utilizados para la dilatación cervical y el trabajo de parto en mujeres (Cervidil®, Ferring Pharmaceuticals, Canadá), causaría la dilatación del cuello uterino antes de la IA y, por lo tanto, disminuiría las dificultades asociadas con atravesar el cuello uterino para la deposición de semen en el cuerpo de la ovejas. El supositorio fue insertado 12 horas antes de la inseminación en 6 ovejas de la raza rideau arcott; 6 ovejas sirvieron como controles no tratados. Se logró depositar el semen en el útero de las 6 ovejas tratadas, mientras que solo fue posible en 4 de las 6 ovejas control. El tratamiento con Cervidil® prometería ser una técnica para mejorar la IA transcervical y permitir procedimientos no invasivos de transferencia de embriones en ovejas (Bartlewski y Candappa, 2015; Candappa et al., 2009).

La utilización de Ox exógena podría facilitar el abordaje transcervical con una cánula de IA al útero de las ovejas (Dos Santos et al., 2020). La Ox permite dilatar el cuello del útero (Khalifa et al., 1992). Una inyección de 100 UI de Ox induce la síntesis de la PGE<sub>2</sub> en la mucosa cervical de los bovinos en el proestro (Fuchs et al., 2002); para que esto suceda deben existir ROx, cuya síntesis tiene lugar cuando existe una relación alta E2/P4 (Sheldrick y Flint, 1985), la cual tiene lugar desde 48 horas antes y durante toda la manifestación del estro en la oveja (Goodman e Inskeep, 2015). Se observó un incremento en los ROx alrededor del tiempo de la ovulación hasta la fase luteal tardía (Rodríguez-Piñón et al., 2014). La alta concentración de E2 registrada 24 a 8 horas previo a la detección del estro (Rodríguez-Piñón, 2015) genera un ambiente propicio para que los ROx se sinteticen. De esta manera, la Ox podría unirse a su receptor de membrana e inducir a través de sus mediadores (cPLA<sub>2</sub>; AA; COX<sub>2</sub>) la contracción del músculo liso y la modificación del colágeno cervical. Esto permite una mayor elasticidad y apertura del canal cervical durante el estro (Rodríguez-Piñón, 2015). Este efecto ha sido observado durante la utilización de Ox exógena en ovejas, lo que permitió el pasaje transcervical de una cánula de IA de vacunos al útero

(Sayre y Lewis, 1996), sin verse afectado el movimiento de los espermatozoides a la región de fertilización (Sayre y Lewis, 1997). Se observó también un incremento de la tasa ovulatoria en las ovejas tratadas con dosis consecutivas (King y Coetzer, 1996) y con un preparado de liberación lenta de Ox (King y Coetzer, 1997). Este comportamiento también fue observado en ratas, en las que la Ox aumentó el número de folículos y cuerpos lúteos en los animales tratados respecto al control (Robinson et al., 1985).

## 1.6. Carbetocina

La carbetocina es un análogo de la Ox de mayor actividad biológica (Atke y Vilhardt, 1987), presenta una vida media en sangre de 30 a 40 minutos cuando se inyecta por vía intramuscular e intravenosa y es utilizada para tratamiento de hemorragias posparto en la mujer (Rath, 2009). Tiene una mayor afinidad con los ROx que la propia Ox y posee una menor actividad uterotónica que la Ox (Atke y Vilhardt, 1987). La carbetocina puede desencadenar una actividad biológica que se mantiene por hasta 12 horas en vacas lecheras (Bajcsy et al., 2006). Podría tener un efecto similar a las reacciones descritas por Falchi y Scaramuzzi (2013, 2015). De esta manera, se obtiene una mayor producción de PGE<sub>2</sub> (Fuchs et al., 2002), lo que podría incrementar la distensión de los tejidos que integran el cérvix y facilitar la penetración del cuello uterino (Bartlewski y Candappa, 2015). Al mismo tiempo, podría verse incrementada la tasa ovulatoria en las ovejas tratadas respecto al control (King y Coetzer, 1997).

## 1.7. Hipótesis y objetivos

### 1.7.1. Hipótesis

El uso de carbetocina 12 horas antes de la IA aumenta la penetración del cuello uterino, la producción de PGE<sub>2</sub> cervical y la penetrabilidad espermática del moco cervical, lo que redunda en un incremento de la fertilidad y la prolificidad de la IA de ovejas.

### 1.7.2. Objetivo general

El objetivo general fue evaluar el efecto de la administración de carbetocina, previo a la IA de ovejas sobre la penetración cervical y la fertilidad y prolificidad en una IA intracervical con semen congelado-descongelado y compararla con la IATF IU por vía laparoscópica. Adicionalmente, se evaluaron características del moco cervical de ovejas tratadas y no tratadas con carbetocina que podrían explicar parte de los resultados en fertilidad.

### 1.7.3. Objetivos específicos

- Comparar la evolución en la penetración cervical durante la manifestación de estro en ovejas multíparas.
- Comparar la fertilidad y prolificidad de ovejas nulíparas, primíparas y multíparas con y sin tratamiento con carbetocina, IA IU (laparoscópica) e IC.
- Comparar la penetración cervical al momento de la IA en ovejas nulíparas, primíparas y multíparas con y sin tratamiento con carbetocina.
- Evaluar la penetrabilidad *in vitro* de los espermatozoides incubados en el moco cervical colectado de ovejas multíparas con y sin tratamiento con carbetocina.

## 1.8. **Estrategia de investigación**

### 1.8.1. Generalidades

El trabajo fue realizado con ovejas del tipo merino (australiano y dohne), consideradas como productoras de lanas ultrafina y doble propósito en varios países. Esto permite darle una amplia aplicabilidad de los resultados en muchos países teniendo en cuenta de que la raza merino es de las más estudiadas en el mundo. Los experimentos fueron realizados utilizando 430

animales alimentados con pasturas naturales de la zona de basalto, zona que ocupa un 21 % del territorio nacional y nuclea más del 50 % de los ovinos del país.

#### 1.8.2. Penetración cervical y penetrabilidad espermática del moco cervical en ovejas multíparas merino australiano

Se estudiaron aspectos básicos que pudieran generar información para evaluar el comportamiento de la carbetocina en un diseño a mayor escala. En treinta ovejas con estros sincronizados, tratadas y no tratadas con carbetocina, se estudió como evolucionó la penetración cervical desde las 36 hasta las 66 h pos-eCG. La concentración de E2 y P4, las principales hormonas involucradas en la generación de ROx, fue monitoreada. En el mismo período, se estudió el efecto de la carbetocina sobre la penetrabilidad de los espermatozoides descongelados a través del moco cervical colectado.

#### 1.8.3. Penetración cervical, concentración de prostaglandina E2 en moco cervical, fertilidad y prolificidad en ovejas nulíparas, primíparas y multíparas merino dohne

En 400 ovejas distribuidas en un diseño al azar con arreglo factorial de 2 x 2 x 3, considerando dos técnicas de IA (intrauterina por laparoscopia e intracervical), dos niveles de tratamiento (sin y con carbetocina) y 3 niveles de paridad (nulípara, primípara y multípara), se evaluó el efecto de la carbetocina sobre la penetración cervical, sobre la fertilidad y prolificidad de la IATF IU e IC.

En 200 ovejas distribuidas en un diseño al azar con arreglo factorial de 2 x 3, considerando dos niveles de tratamiento (sin y con carbetocina) y 3 niveles de paridad (nulípara, primípara y multípara), se evaluó el efecto de la carbetocina sobre la penetración cervical de la IATF IC.

## **2. Materiales y métodos**

### **2.1. Penetración cervical y penetrabilidad espermática del moco cervical en ovejas multíparas merino australiano**

#### **2.1.1. Ubicación, animales y alimentación**

El experimento se realizó en las instalaciones de la Estación Experimental de la Facultad de Agronomía (Salto), en estación reproductiva entre los meses de marzo y abril del 2019. Todos los procedimientos realizados contaron con la aprobación del comité de ética en el uso de animales (CEUA) de la Facultad de Agronomía (número de protocolo 780, expediente 020300-001755-18). Se estudió la penetración cervical con cánula de IA para bovinos en 30 ovejas multíparas de la raza merino australiano (MA). Los animales fueron identificados con caravanas individuales y pinturas de colores durante la asignación de los tratamientos. Se determinó el peso vivo (PV) utilizando una balanza de 0,5 kg de precisión y la condición corporal (CC) en la escala 1 a 5 (Jeffries, 1961). Ambas medidas se efectuaron los primeros días de febrero del 2019, 15 días antes de la asignación de las ovejas a cada tratamiento.

Las ovejas fueron distribuidas balanceando los animales a cada grupo con base en el PV, la CC y la tasa ovulatoria potencial (TOP) determinada a partir de una ecografía ovárica realizada a las 20 horas posretiro de las esponjas (punto 2.1.4.1). Las ovejas pesaron  $49,2 \pm 0,52$  kg, la CC de las ovejas multíparas fue  $3,2 \pm 0,03$  y la TOP fue de  $1,40 \pm 0,52$ . Las ovejas se manejaron sin restricciones de ningún tipo a base de campo natural durante todo el período experimental. Un mes antes del inicio del experimento se realizó vacunación contra clostridiosis y un análisis coprológico (HPG) de las ovejas que dio un promedio de 0 HPG para todas las que ingresaron al experimento.

### 2.1.2. Diseño experimental

El diseño experimental utilizado fue un diseño completamente al azar, balanceado por TOP, PV y CC

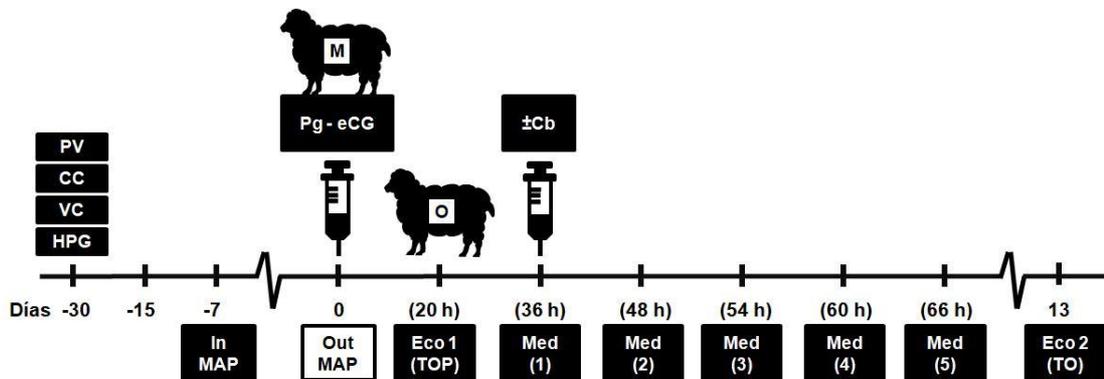
### 2.1.3. Protocolo de sincronización de la ovulación

#### 2.1.3.1. Protocolo de sincronización de ovejas merino australiano

Se realizó un protocolo corto de sincronización de 7 días de esponjas intravaginales de MAP (60 mg de acetato de medroxiprogesterona, laboratorio Syntex, Buenos Aires, Argentina). Al momento de retirar las esponjas se inyectó una dosis de 350 UI de eCG (Novormon® 5000, laboratorio Syntex, Buenos Aires, Argentina) y una dosis de un análogo de PGF<sub>2</sub>α de 125 mg de DL-cloprostenol IM (Ciclase DL®, laboratorio Syntex, Buenos Aires, Argentina). Teniendo en cuenta que la expresión de ROx en el cérvix ovino fue máxima entre las 32 y 44 horas posteriores al retiro de las esponjas e inyección de PGF<sub>2</sub>α (Falchi y Scaramuzzi, 2013), se realizó la inyección IM de 0,05 mg (1 mL) de carbetocina (Decomoton®, laboratorio Calier, Argentina) por oveja a las 36 horas de retiradas las esponjas a la mitad de las ovejas (figura 5).

**Figura 5**

*Esquema de manejo experimental realizado a 30 ovejas.*



*Nota.* Determinación de peso vivo (PV), condición corporal (CC), vacunación para clostridiosis (VC), análisis coprológico (HPG), colocación de esponjas de acetato de medroxiprogesterona (in MAP), retiro de esponjas de acetato de medroxiprogesterona (out MAP), prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$  (Pg), gonadotropina coriónica equina (eCG), capones androgenizados (M), separación de ovejas (O) en 2 tratamientos. Inyección de carbetocina IM ( $\pm$ Cb) aplicada a 15 ovejas, tasa ovulatoria potencial (TOP), tasa ovulatoria (TO), mediciones realizadas (med).

#### 2.1.3.2. Protocolo de androgenización de los capones

Se utilizaron 3 capones androgenizados para controlar el protocolo de sincronización y bioestimular a las 30 ovejas y detectar el momento de inicio de estro. Los capones ingresaron enseguida del retiro de las esponjas y permanecieron junto a todas las ovejas durante el período experimental. El protocolo para androgenizar los capones consistió en 3 dosis de 100 mg ciclopentilpropionato de testosterona por animal (Testosterona Ultra Lenta®, laboratorios Dispert, Uruguay) con una separación de 7 días (días -14, -7 y 0, respecto al retiro de las esponjas) (Fierro et al., 2016). Los animales fueron

pintados con tierra de color diariamente; de esta manera, las ovejas que eran montadas quedaban marcadas en la zona de la grupa.

#### 2.1.4. Toma de muestras y registros

##### 2.1.4.1. Diagnóstico ovárico, tasa ovulatoria potencial, penetración cervical y tasa ovulatoria

Se realizó el diagnóstico de actividad ovárica de las ovejas a las 20 horas (eco 1) y a los 13 días desde el retiro de las esponjas (eco 2) mediante ultrasonografía. En la eco 1 se registró el diámetro de todos los folículos y el número de cuerpos lúteos presentes en ambos ovarios. Con el objetivo de balancear las ovejas durante la conformación de los grupos, se asignó a cada oveja un valor de tasa ovulatoria potencial (TOP) entre 1 y 3. Este valor es determinando con base en el estudio del conteo de los folículos con diámetros mayor o igual que 4 mm o el número de cuerpos lúteos que estaban presentes al momento de la eco 1. La eco 2 se realizó para determinar la tasa ovulatoria (TO) con base en el conteo de cuerpos lúteos. En ambos casos se utilizó un ecógrafo (Aloka Prosound 2, Tokyo, Japón) con transductor recto de 7,5 MHz, transrectal.

##### 2.1.4.2. Penetración cervical

Se midió penetración cervical con pipetas de IA (Minitub, codo 17300/0000, Alemania) deslizando por fuera de la cánula una vaina universal de IA para bovinos, que, al ubicarse sobre el orificio cervical externo a manera de tope, permitió medir la profundidad alcanzada por la cánula en la IA IC. Al retirar la cánula, se midió con una regla milimetrada el espacio que quedó entre la punta de la cánula y el tope que presentó la vaina plástica (Gil et al., 2005). Las mediciones de penetración cervical fueron realizadas a las 36, 48, 54, 60 y 66 horas desde el retiro de las esponjas y expresada en mm.

#### 2.1.4.3. Penetrabilidad espermática del moco cervical *in vitro*

En el laboratorio se realizaron la colecta y el estudio de 24 muestras de moco cervical de las ovejas utilizando una pipeta aspirando todo el moco disponible alrededor del cuello uterino (Adams y Tang, 1979), a las 48 y 54 horas desde el retiro de las esponjas. Se realizó el test de penetración del moco cervical de Alexander (1981) modificado. Para el test se prepararon los tubos capilares (se utilizaron tubos redondos en lugar de los planos) llenándolos con moco cervical. Se sellaron por ambos extremos dejando aire entre el sellador y el moco. Se dejó una columna de moco de 50 mm mínimo. Se almacenó a -20 °C durante 1 mes. El descongelado de estos tubos capilares se realizó a temperatura ambiente y sobre una mesa térmica (37 °C) durante 10 min. Para realizar el test, se quebró con una pieza de metal 1 de los extremos sellado dejando aproximadamente 1 mm al menisco de moco. El extremo cortado se insertó en 150 µL de semen y se incubó sobre mesa térmica a 37 °C durante 10 minutos (se realizaron lecturas repetidas en el tiempo, recolocando el capilar en el depósito de semen nuevamente). Se retiró el tubo del depósito de semen y se limpió con papel higiénico. Se colocó sobre un portaobjeto (calibrando milimétricamente con permanente el portaobjeto) con cinta adhesiva y se llevó a la platina del microscopio para la lectura. Se registró la distancia (en mm) cubierta por la vanguardia de espermatozoides, a 250 x 400 x en óptica de fase. Se procuró que no se formaran burbujas de aire en el tubo, dado que esto bloquea la penetración del esperma. Se realizó por duplicado colocando 2 tubos capilares en el mismo depósito de semen. En ninguna de las muestras la vanguardia llegó al extremo opuesto.

#### 2.1.4.4. Determinación de estradiol y progesterona

Se realizó la extracción de muestra de sangre mediante punción de la vena yugular a las 36, 48, 60 y 66 horas posretiro de las esponjas. Las muestras extraídas fueron depositadas en tubos sin anticoagulante, refrigeradas y posteriormente centrifugadas durante 10 minutos a 3500 rpm. El suero fue colocado en tubos de Eppendorf rotulados y congelados en un freezer a -20 °C hasta el momento de su análisis.

Las concentraciones E2 y P4 en suero se determinaron en el Laboratorio de Análisis Clínico, Endocrinología y Metabolismo Animal (Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay). Las concentraciones de E2 fueron determinadas por un radio inmuno ensayo (RIA) en fase líquida utilizando kits de MP (MP Biomedicals, Inc. Solon, OH 44139 Estados Unidos). La concentración mínima detectable del ensayo fue de 9,54 pmol/L. El coeficiente de variación intraensayo para el control 1 (38,2 pmol/L) fue 14,4 % y el coeficiente de variación interensayo para el mismo control fue 14,3 %. Las concentraciones de P4 fueron determinadas por un RIA en fase sólida utilizando kits de MP (MP Biomedicals, Inc. Solon, OH 44139 Estados Unidos). La concentración mínima detectable del ensayo fue de 0,22 nmol/L. Los coeficientes de variación intraensayo para el control 1 (0,92 nmol/L) y el control 2 (20,2 nmol/L) fueron 11,2 % y 2,6 %, respectivamente.

## 2.2. **Penetración cervical, concentración de prostaglandina E2 en moco cervical, fertilidad y prolificidad en ovejas nulíparas, primíparas y múltíparas merino dohne**

### 2.2.1. Ubicación, animales y alimentación

Se realizó una IA a tiempo fijo (IATF) con semen congelado *pool* a 400 ovejas de la raza merino dohne (MD) de 2, 4, 6 y 8 dientes, a principio de marzo. Los animales fueron identificados con caravanas individuales y pinturas de colores durante la asignación de los tratamientos y en la IA

propriadamente dicha. Se determinó el PV utilizando una balanza de 0,5 kg de precisión; también se determinó la CC en la escala 1 a 5 (Jeffries, 1961). Ambas medidas se efectuaron los primeros días de febrero del 2018, 15 días antes de la asignación de las ovejas a cada tratamiento. Las ovejas fueron distribuidas al azar según su paridad (nulíparas, primíparas y multíparas). Las ovejas nulíparas pesaron  $43,5 \pm 0,50$  kg, las primíparas  $50,7 \pm 0,44$  kg y las multíparas  $50,1 \pm 0,50$  kg. La CC de las ovejas nulíparas fue  $3,02 \pm 0,02$ , la de las primíparas fue  $3,14 \pm 0,02$  y la de las multíparas fue  $3,01 \pm 0,02$ . Los animales se manejaron sin restricciones de ningún tipo a base de campo natural con acceso a sal fosfatada al 12 % y campo natural mejorado con *Lotus subbiflorus* (cultivar El Rincón) durante todo el período experimental. Un mes antes del inicio del experimento se realizó vacunación contra clostridiosis y un análisis coprológico (HPG) de las ovejas que ingresaron al experimento.

### 2.2.2. Diseño experimental

El diseño experimental utilizado fue un diseño completamente al azar, con arreglo factorial de  $2 \times 2 \times 3$ : 2 técnicas de IA (intrauterina por laparoscopia e intracervical), 2 niveles de hormona (sin y con carbetocina) y 3 niveles de paridad (nulípara, primípara y multípara).

### 2.2.3. Protocolo de sincronización de la ovulación

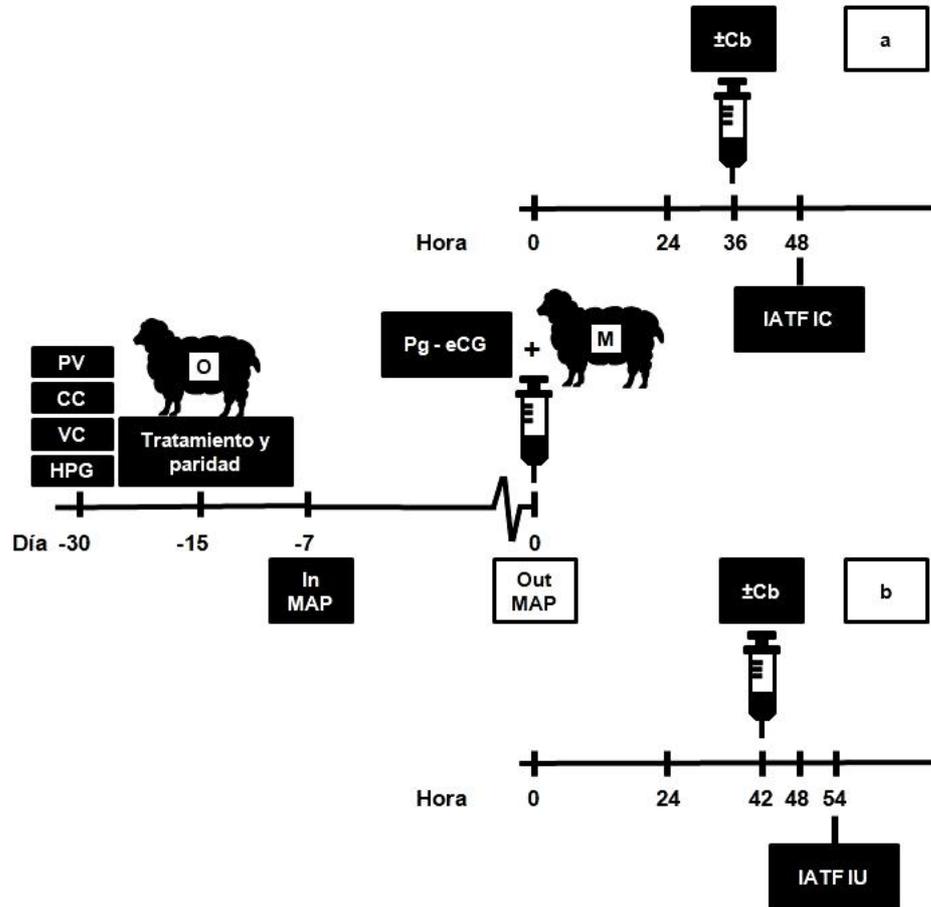
#### 2.2.3.1. Protocolo de sincronización de ovejas merino dohne

Se sincronizaron las ovulaciones de 400 ovejas en 2 lotes de 200 animales (figura 6). La IA IU por vía laparoscópica y la IA IC se realizaron con menos de un día de desfase (Menchaca et al., 2004; Gibbons et al., 2019), con el objetivo de no solapar labores que pudiesen generar problemas en la ejecución del experimento. Se realizó un protocolo corto de sincronización de 7 días de esponjas intravaginales de MAP (60 mg de acetato de

medroxiprogesterona, laboratorio Syntex, Buenos Aires, Argentina). Al retirar las esponjas, se inyectó una dosis de 350 UI de eCG (Novormon® 5000, laboratorio Syntex, Buenos Aires, Argentina) y una dosis de un análogo de PGF<sub>2</sub>α de 125 mg de closprostenol sódico IM (Ciclase DL®, laboratorio Syntex, Buenos Aires, Argentina). Se inyectó 0,05 mg por oveja de carbetocina (Decomoton®, laboratorio Calier, Argentina) IM 12 horas antes del momento de la inseminación fijado para cada tratamiento con base en las mismas consideraciones que en el experimento anterior (Falchi y Scaramuzzi, 2013).

**Figura 6**

*Esquema de manejo experimental realizado a 400 ovejas.*



*Nota.* Determinación de peso vivo (PV), condición corporal (CC), vacunación para clostridiosis (VC), análisis coprológico (HPG), separación de ovejas (O) por tratamiento y paridad (tratamiento y paridad), colocación de esponjas de acetato de medroxiprogesterona (in MAP), retiro de esponjas de acetato de medroxiprogesterona (out MAP), prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$  (Pg); gonadotropina coriónica equina (eCG), capones androgenizados (M). (a) Protocolo de inseminación artificial a tiempo fijo intracervical (IATF IC) a las 48 horas desde out MAP realizada a 200 ovejas. (b) Protocolo de inseminación artificial a tiempo fijo intrauterina (IATF IU) realizada a las 54 horas desde out MAP realizada a 200 ovejas. Inyección IM de carbetocina 12 horas antes de la IATF ( $\pm$ Cb) aplicada a 100 ovejas de cada técnica de IA.

#### 2.2.3.2. Protocolo de androgenización de los capones

Se utilizaron 20 capones androgenizados para bioestimular a las 400 ovejas, estos ingresaron enseguida del retiro de las esponjas. El protocolo para androgenizar los capones consistió en 3 dosis de 100 mg ciclopentilpropionato de testosterona por animal (Testosterona Ultra Lenta®, Laboratorios Dispert, Uruguay) con una separación de 7 días (día -14, -7 y 0 respecto al retiro de las esponjas) (Fierro et al., 2016).

#### 2.2.4. Características del semen congelado utilizado

El semen utilizado fue un *pool* de 4 carneros previamente evaluados por el sistema *computer assisted sperm analysis* (CASA). El *pool* fue constituido en el momento previo a inseminar cada una de las ovejas. El porcentaje de espermatozoides progresivos en la dosis de 0,25 mL por oveja fue de 68,7 millones, con un vigor de 106,3 velocidad curvilínea (VCL)  $\mu\text{m/s}$ , la distancia de la trayectoria circular (DCL) 30,7  $\mu\text{m/s}$ , la velocidad media (VAP) 51,3  $\mu\text{m/s}$ .

#### 2.2.5. Toma de muestras y registros

La inseminación se inició a las 48 (Menchaca et al., 2004) y 54 (Gibbons et al., 2019) horas por vía IC y IU laparoscópica, respectivamente. La IA fue realizada por 3 inseminadores, 1 para el método de inseminación IU por vía laparoscópica y 2 para la inseminación IC. Estos inseminaron el mismo número de ovejas y no existió diferencia en penetración cervical o fertilidad entre los inseminadores de la técnica IC. No se registraron precipitaciones 15 días antes o después de realizada la IA.

### 2.2.6. Mediciones realizadas en los animales

Se midió penetración cervical, se extrajo moco cérvico-vaginal para determinar concentración de PGE<sub>2</sub> y se detectaron gestación y número de fetos a la ecografía. Se midió penetración cervical con pipetas de IA (Minitub, código 17300/0000, Alemania) deslizando por fuera de la cánula una vaina universal de IA para bovinos, que, al ubicarse sobre el orificio cervical externo a manera de tope, permitió medir la profundidad alcanzada por la cánula en la IA IC. Se midió con una regla milimetrada al retirar la cánula el espacio que quedó entre la punta de la cánula y el tope que presentó la vaina plástica (Gil et al., 2005).

Se colectaron muestras de moco cervical en algunas de las ovejas que fueron inseminadas por laparoscopia para determinar la concentración de PGE<sub>2</sub> en el moco cervical. La colecta del moco fue realizada en 8 y 7 ovejas del grupo control y carbetocina, respectivamente, utilizando una pipeta aspirando todo el moco disponible alrededor del cuello uterino (Adams y Tang, 1979).

Se realizó el diagnóstico de gestación y de la carga fetal por ultrasonografía a los 50 días de la IATF utilizando un ecógrafo (Aloka Prosound 2, Tokyo, Japón) con transductor convexo de 3,5 MHz, transabdominal. Los registros fueron utilizados para calcular la fertilidad ( $\text{n.}^\circ \text{ hembras preñadas} / \text{n.}^\circ \text{ hembras servidas} \times 100$ ) y prolificidad ( $\text{n.}^\circ \text{ fetos} / \text{n.}^\circ \text{ hembras preñadas} \times 100$ ).

### **2.3. Análisis estadístico**

#### **2.3.1. Penetración cervical y penetrabilidad del moco cervical en ovejas multíparas merino australiano**

La penetración cervical fue analizada como medidas repetidas en el tiempo. La penetrabilidad del moco cervical fue analizada con un PROC MIXED del software SAS OnDemand, ajustando un modelo donde la penetrabilidad espermática del moco cervical es función del efecto de la hormona, el tiempo y la interacción entre hormona y tiempo.

#### **2.3.2. Penetración cervical, concentración de prostaglandina E<sub>2</sub> en moco cervical, fertilidad y prolificidad en ovejas nulíparas, primíparas y multíparas merino dohne**

Se analizó la variable penetración cervical con las ovejas que fueron inseminadas IC. Para esto se utilizó un procedimiento PROC GLIMMIX del software SAS OnDemand. Se ajustó un modelo donde la penetración cervical es función del efecto de la hormona, la paridad de las ovejas y la interacción entre hormona y paridad. Se consideró que la distribución de la variable es normal con base en el estudio de los residuales.

Se realizó una prueba de comparación de medias de la concentración de PGE<sub>2</sub> en el moco cervical de las ovejas, se consideró que la variable presenta una distribución normal con base en la revisión de bibliografía (Dorniak et al., 2012).

La fertilidad fue analizada considerando el total de las ovejas inseminadas que llegaron a la ecografía; se utilizó un procedimiento PROC GLIMMIX del software SAS OnDemand. Se ajustó un modelo donde la fertilidad es función del efecto de las técnicas de inseminación, de la hormona y la paridad de las ovejas. Se consideró una distribución binomial. El porcentaje de prolificidad

fue analizado considerando el total de fetos sobre las ovejas gestantes; se utilizó el test exacto de Fisher.

Se consideró para todas las pruebas realizadas un valor de la probabilidad ( $P \leq 0,05$ ) para hablar de diferencias significativas, cuando los valores de la probabilidad fueron  $P > 0,05$  y  $\leq 0,10$  se consideró como tendencia.

### **3. Resultados**

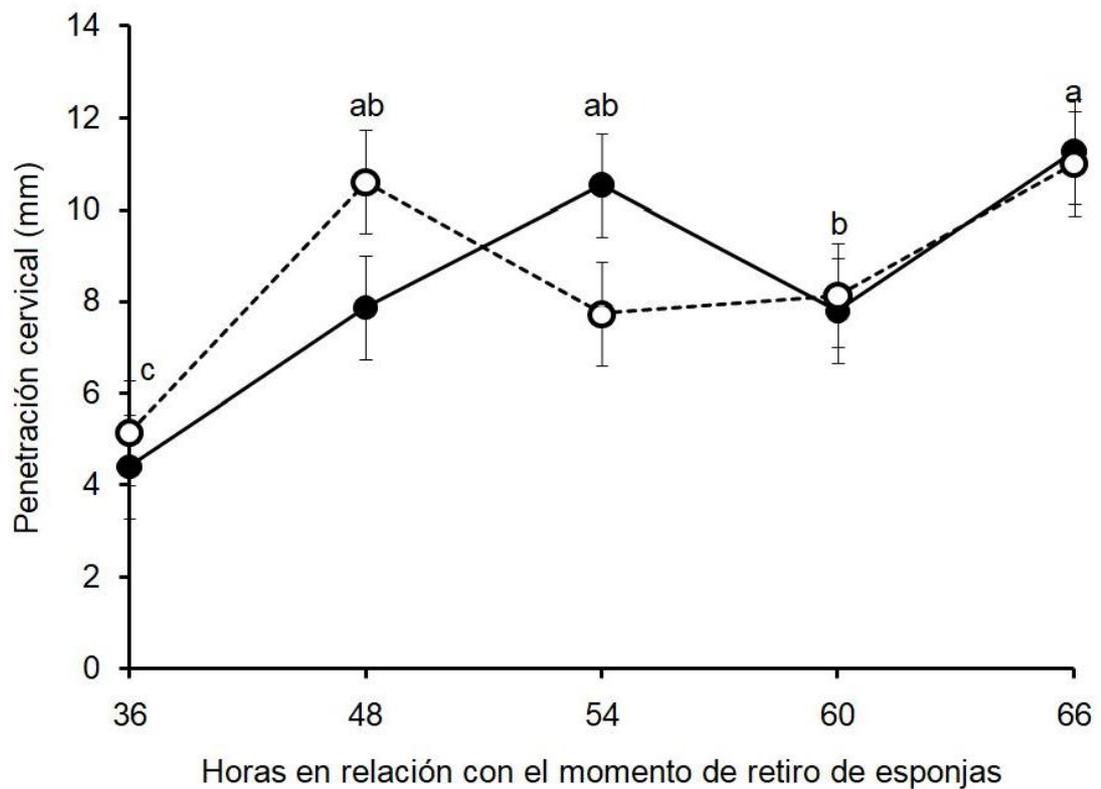
#### **3.1. Penetración cervical y penetrabilidad espermática del moco cervical en ovejas multíparas merino australiano**

##### **3.1.1. Penetración cervical**

No existieron diferencias en la penetración cervical obtenida que puedan asociarse al efecto del tratamiento respecto al control ( $P = 0,8566$ ). Sin embargo, existieron diferencias en la penetración cervical obtenida en relación con el tiempo ( $P < 0,0001$ ). La penetración cervical obtenida a las 36 horas posretiro de la esponja fue de  $4,7 \pm 0,80$  mm, la menor de todo el período evaluado. La penetración cervical de todas las ovejas en conjunto, obtenida durante las 48, 54 y 66 horas, no difirió entre sí ( $9,3$ ;  $9,1$ ; y  $11,1 \pm 0,80$  mm, respectivamente). Sin embargo, la penetración cervical registrada a las 60 horas ( $7,9 \pm 0,80$  mm) difirió de la registrada a las 66 horas (figura 7).

**Figura 7**

*Evolución de la penetración cervical (mm) de ovejas con celo sincronizado con  $\text{PGF}_2\alpha$  y eCG no tratadas (control=línea punteada y punto blanco) y tratadas (carbetocina=línea continua y punto negro) con 0,05 mg de carbetocina im a las 36 h posretiro de las esponjas (n=15 cada grupo).*



*Nota.* Letras diferentes para diferentes horas de muestreo indican diferencias significativas entre muestreos ( $P \leq 0,05$ ).

### 3.1.2. Perfil de E2 y de P4

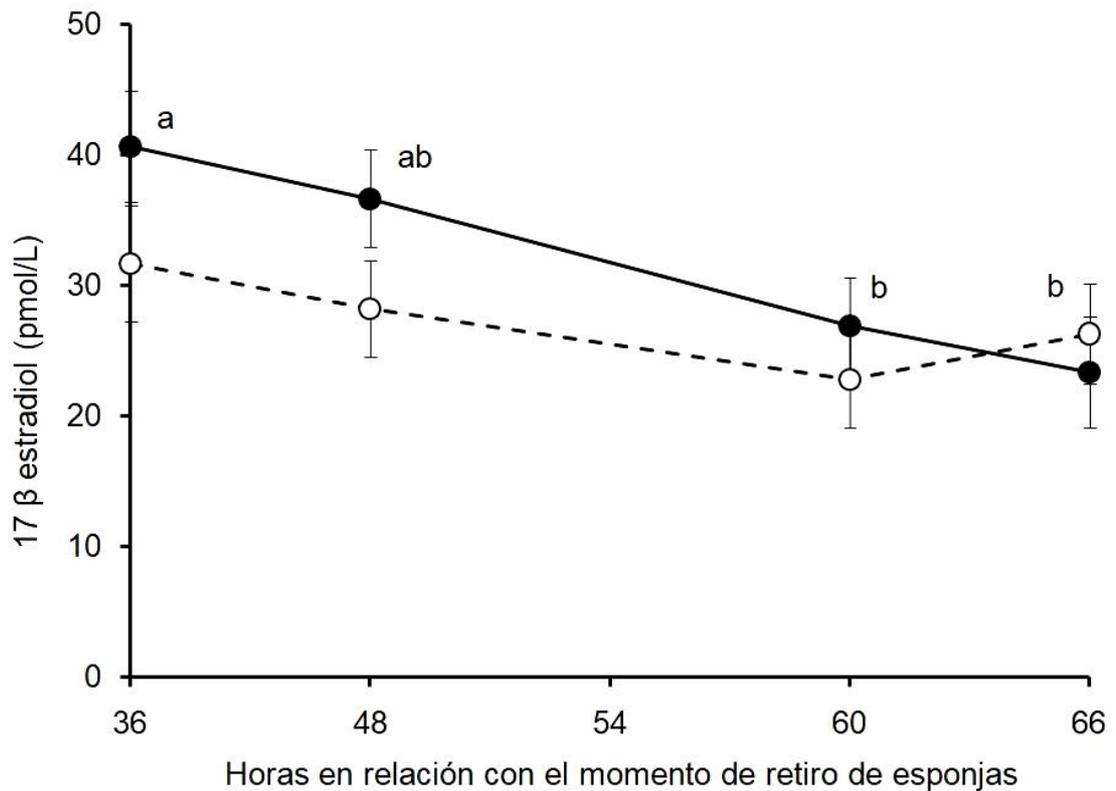
No se encontraron diferencias en la concentración de E2 (pmol/L) en sangre de las ovejas con y sin carbetocina siendo 36,7 y 31,5 en ovejas del grupo control y carbetocina, respectivamente ( $P = 0,2518$ ). Sin embargo, se encontraron diferencias en la concentración de E2 en sangre vinculadas al momento en el que se extrajo la muestra ( $P < 0,0180$ , Figura 8). La

concentración de E2 promedio fue más elevada en la determinación realizada a las 36 horas respecto a las registradas a las 60 y 66 horas. No difirió entre las 36 y las 48 horas, y no difirió entre las 48, las 60 y 66 horas.

Las concentraciones de P4 para la mayoría de las ovejas del experimento fueron basales de  $0,07 \pm 0,167$  nmol/L (control) y  $0,08 \pm 0,192$  nmol/L (carbetocina) promedio para el período entre las 36 y 66 horas. No se encontraron diferencias en la concentración de P4 en sangre en las muestras obtenidas de las ovejas con y sin carbetocina, ni en los valores E2 y P4 obtenidos a las 36, 48, 60 y 66 horas posretiro de las esponjas. Una de las ovejas del grupo control que no manifestó estro durante el período evaluado, reportó valores de 4,3; 9,1; 3,1 y 2,7 nmol/L a las 36, 48, 60 y 66 horas posretiro de la esponja, respectivamente, por lo que la oveja fue descartada en los posteriores análisis.

**Figura 8**

Concentración sérica de 17  $\beta$  estradiol (pmol/L) en sangre de ovejas con celo sincronizado con  $PGF_{2\alpha}$  y eCG no tratadas (control=línea punteada y punto blanco) y tratadas (carbetocina=línea continua y punto negro) con 0,05 mg de carbetocina im a las 36 h posretiro de las esponjas (n=15 cada grupo).



*Nota.* Letras diferentes para diferentes horas de muestreo indican diferencias significativas entre muestreos ( $P \leq 0,05$ ).

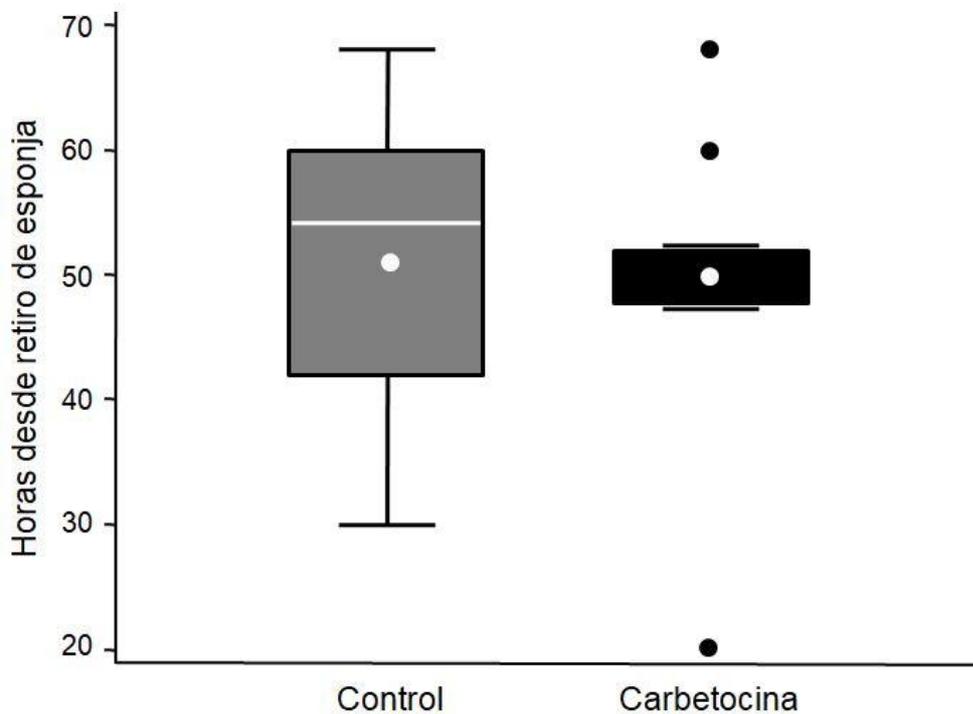
### 3.1.3. Expresión de estro

Las ovejas marcadas por los capones androgenizados presentaron valores promedios para inicio del estro a las  $50,8 \pm 14,43$  y  $49,8 \pm 11,64$  horas para los grupos control y carbetocina, respectivamente, con un rango que va desde las 20 hasta las 68 horas posretiro de las esponjas (figura 9).

Un total de 8 de las 30 ovejas estudiadas en el experimento no fueron marcadas por los capones androgenizados; sin embargo, una de las 4 ovejas del grupo control y 3 de las 4 ovejas del grupo carbetocina que no habían sido marcadas presentaron una concentración de E2 similar al de las ovejas que iniciaron su estro a las 48 horas posretiro de las esponjas. Las ovejas marcadas por los capones androgenizados presentaron una dispersión importante en cuanto al momento de inicio del estro: el rango observado se encontró desde las 20 horas hasta las 68 horas posretiro de esponja, lo que hace suponer que la sincronización las ovejas del grupo control fue menor a la obtenida en el grupo carbetocina.

### Figura 9

Momento de inicio de estro según la marca de capones androgenizados de ovejas MA con estro sincronizado con  $PGF_{2\alpha}$  y eCG no tratadas (control,  $n=11$ ) y tratadas (carbetocina,  $n=11$ ) con 0,05 mg de carbetocina im a las 36 h posretiro de las esponjas: media (punto blanco), mediana, cuartiles superior e inferior, outlier (punto negro) y desvío estándar registrado en ovejas.

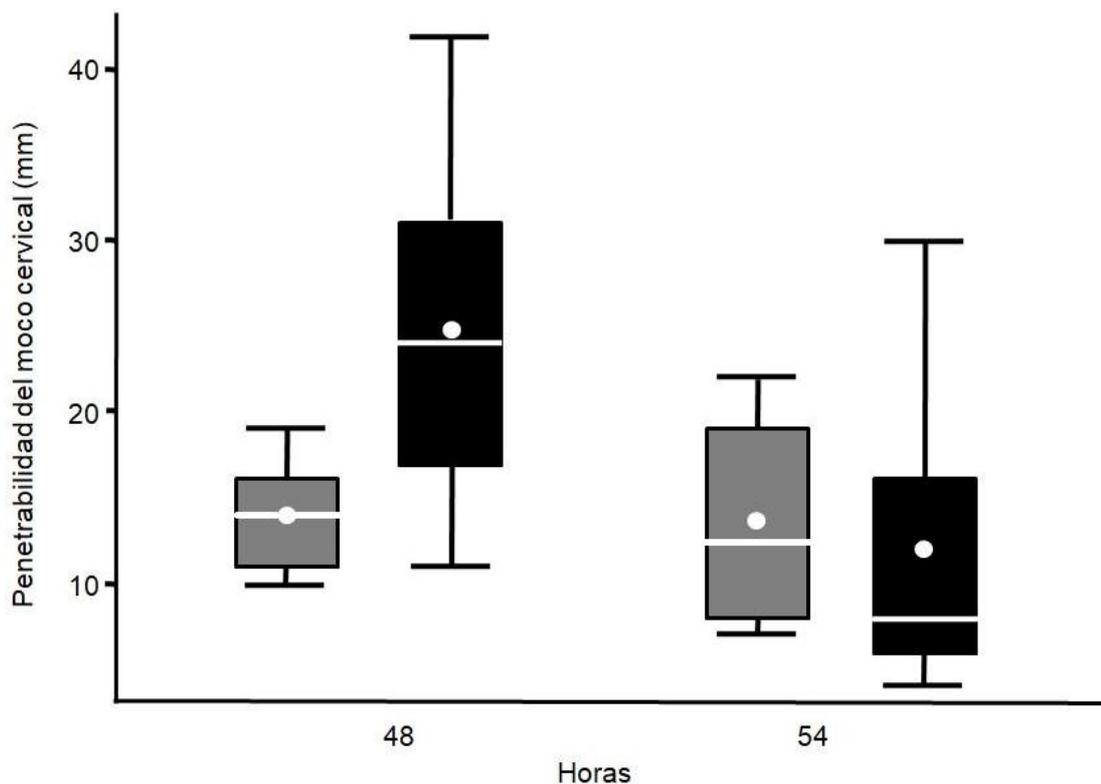


#### 3.1.4. Penetrabilidad espermática del moco cervical

No existieron diferencias significativas en la penetrabilidad espermática en el moco cervical de las ovejas del grupo control y el grupo carbetocina ( $P \geq 0,05$ ). Sin embargo, se observó una tendencia ( $P = 0,08$ ) en la penetrabilidad espermática entre los mocos colectados a las 48 y 54 horas, registrándose penetrabilidades de  $19,4 \pm 2,34$  en relación con  $12,8 \pm 2,34$  mm para las 48 y 54 horas, respectivamente. Existió una tendencia en la penetrabilidad espermática en la interacción entre el efecto de la hormona y el tiempo ( $P = 0,10$ ) (figura 10).

**Figura 10**

*Penetrabilidad espermática del moco cervical ovejás MA con estro sincronizado con  $PGF_{2\alpha}$  y eCG no tratadas (control, barra color gris,  $n=6$ ) y tratadas (carbetocina, barras color negro,  $n=6$ ) con 0,05 mg de carbetocina im a las 36 h posretiro de las esponjas colectado a las 48 y 54 horas posretiro de las esponjas, media (punto blanco), mediana (línea blanca), cuartiles superior e inferior y desvío estándar.*



### 3.1.5. Tasa ovulatoria potencial y tasa ovulatoria

El número de ovejás con folículos potencialmente ovulatorios, determinado con base en la eco 1, fue similar entre grupos (control = 9/15; carbetocina = 8/15). El TOP no fue diferente entre ovejás pertenecientes al grupo control y carbetocina ( $1,40 \pm 0,74$  y de  $1,40 \pm 0,63$ , respectivamente). No se encontraron diferencias ( $P = 0,6038$ ) en la TO de las ovejás pertenecientes

al grupo control y carbetocina ( $1,80 \pm 0,37$  y de  $2,07 \pm 0,37$ , respectivamente). La correlación entre TOP y TOR fue de 0,33 positiva, significativa ( $P = 0,07$ ).

### **3.2. Penetración cervical, concentración de prostaglandina E2 en moco cervical, fertilidad y prolificidad en ovejas nulíparas, primíparas y multíparas merino dohne**

#### **3.2.1. Penetración cervical**

La penetración cervical difirió entre el grupo control ( $13,8 \pm 1,01$  mm) y en los tratados con carbetocina ( $17,4 \pm 1,03$  mm) ( $P = 0,0015$ ). La paridad afectó la penetración del cuello uterino ( $P = 0,0012$ ), pero no hubo interacción hormona x paridad ( $P = 0,8081$ ). En ovejas multíparas, la penetración cervical fue superior a la registrada en las demás categorías (tabla 2).

**Tabla 2**

*Prueba de comparación de medias de penetración cervical (mm), el EE, e intervalo de confianza según paridad de ovejas MD con celo sincronizado con PGF<sub>2</sub>α y eCG no tratadas (control) y tratadas (carbetocina) con 0,05 mg de carbetocina im a las 36 h posretiro de las esponjas.*

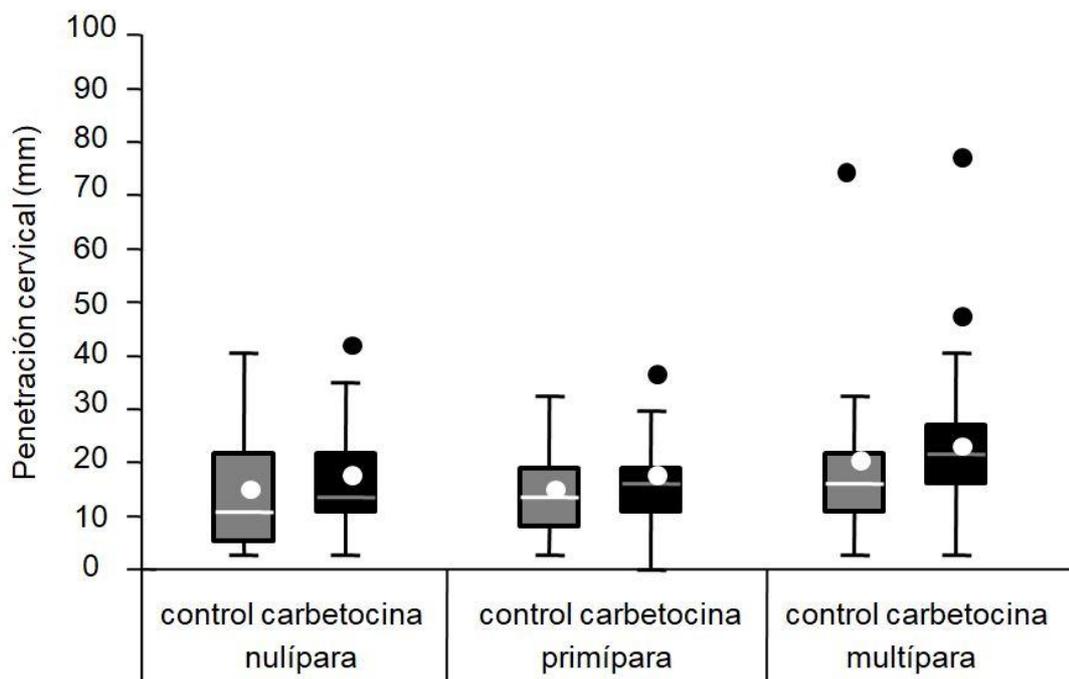
	Nulíparas (n=50)	Primíparas (n=74)	Múltiparas (n=72)
Promedio (mm)	13,7 <b>b</b>	13,8 <b>b</b>	19,3 <b>a</b>
EE (mm)	1,41	1,60	1,80
Límite inferior del intervalo (mm)	10,9	11,5	16,1
Límite superior del intervalo (mm)	16,5	16,1	21,2

*Nota.* a, b: letras diferentes para cada media difieren ( $P < 0,05$ )

No hubo diferencias significativas en la dispersión de la penetración cervical encontrada entre grupos y categorías evaluadas. Sin embargo, la media y la mediana en el grupo carbetocina para cada categoría fue ligeramente superior en comparación con la media y la mediana del grupo control (figura 11).

**Figura 11**

Penetración cervical (mm) media (punto blanco), mediana (línea blanca), cuartiles superior e inferior, outlier (punto negro) y desvío estándar registrado a las 48 horas desde el retiro de las esponjas en ovejas MD con celo sincronizado con  $PGF_{2\alpha}$  y eCG no tratadas (control,  $n = 100$ ) y tratadas (carbetocina,  $n = 95$ ) con 0,05 mg de carbetocina im a las 36 h posretiro de las esponjas agrupadas según paridad.



### 3.2.2. Análisis de prostaglandina E2 en moco cervical

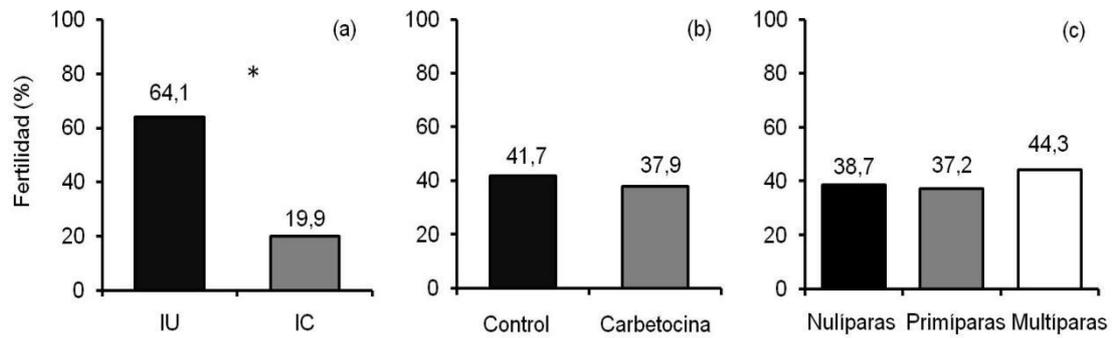
Existieron diferencias significativas ( $P = 0,057$ ) en la concentración de prostaglandina E2 en el moco cervical de las ovejas que fueron tratadas con carbetocina e inseminadas con la técnica IU. La concentración de  $PGE_2$  en el grupo control ( $n=8$ ) fue de  $112 \pm 96$ , mientras que en el grupo tratado con carbetocina ( $n=7$ ) fue de  $445 \pm 128$ .

### 3.2.3. Fertilidad y prolificidad

La fertilidad se vio afectada por el método de IA utilizado; fue 3 veces mayor con el método IU en comparación con el método IC ( $P = 0,0001$ ) (figura 12a). No se observaron diferencias en la fertilidad por carbetocina ( $P = 0,4287$ ) (figura 12b) y, aunque no hubo diferencias significativas entre la paridad de las ovejas ( $P = 0,5363$ ), sí hubo una diferencia no significativa del 5 % en la fertilidad entre las ovejas multíparas y nulíparas (figura 12c). No se encontraron diferencias en la fertilidad cuando se agrupó la penetración cervical obtenida en 3 clases. Sin embargo, la fertilidad se incrementó a medida que la penetración cervical aumentó de 16 a 26 % de fertilidad para las clases 1 y 3, respectivamente ( $P = 0,6077$ ) (tabla 3).

## Figura 12

Fertilidad (%) de ovejas MD con celo sincronizado con  $PGF_{2\alpha}$  y eCG según (a) la técnica de inseminación artificial (IU = intrauterina, IC = intracervical), (b) tratamiento hormonal (control = sin carbetocina, carbetocina = con carbetocina) y (c) paridad. \* indica diferencia entre técnicas ( $< 0,0001$ ).



**Tabla 3**

*Prueba de comparación de medias del porcentaje de fertilidad de la inseminación cervical, el EE, de ovejas MD con celo sincronizado con PGF<sub>2</sub>α y eCG con semen congelado para tres clases de penetración cervical definidas.*

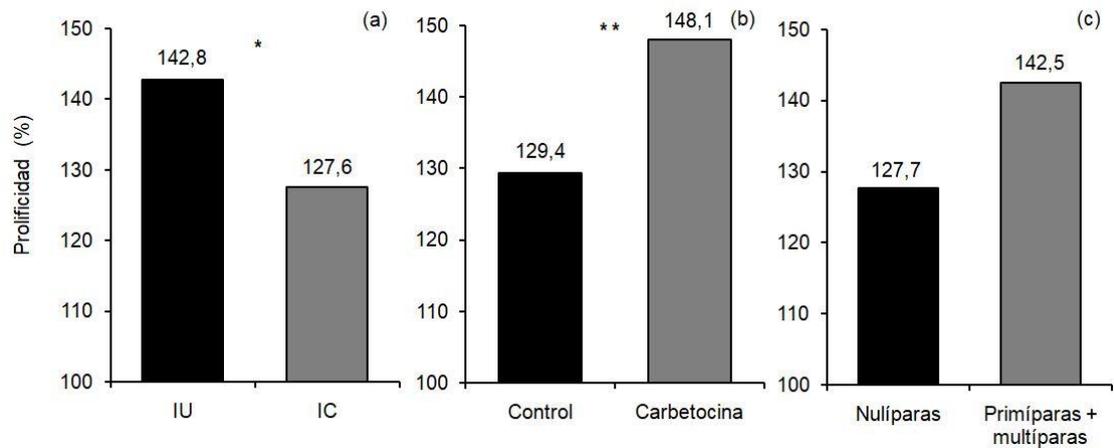
	Clase 1 (0-10 mm) (n=62)	Clase 2 (11-20mm) (n=87)	Clase 3 (21-74mm) (n=44)
Promedio	16	21	26
EE	0,05	0,04	0,06

*Nota.* No existieron diferencias entre clases ( $P > 0,05$ ).

Los métodos IA afectaron la prolificidad ( $P = 0,0364$ ), el método IU presentó un 15,2 % más de prolificidad en comparación con el método IC (figura 13a). Se observaron diferencias en la prolificidad entre el grupo carbetocina y el control ( $P = 0,0090$ ), donde los animales del grupo carbetocina presentaron 18,7 % más de prolificidad en comparación con el control (figura 13b). No hubo diferencias significativas ( $P = 0,1396$ ) en la prolificidad respecto a la paridad de las ovejas; sin embargo, se observó un 14,8 % más de prolificidad en las primíparas y multíparas en comparación con la registrada en las nulíparas (figura 13c).

### Figura 13

*Prolificidad (%) de ovejas MD con celo sincronizado con  $PGF_{2\alpha}$  y eCG según (a) técnica de inseminación artificial (IU = intrauterina, IC = intracervical; \*  $P = 0,0346$ ), (b) tratamiento hormonal (control = sin carbetocina, carbetocina = con carbetocina; \*\*  $P = 0,00090$ ) y (c) paridad nulíparas y primíparas + múltiparas.*



## 4. Discusión

### 4.1. Hipótesis

En el experimento realizado con merino australiano se rechaza la hipótesis, dado que la penetración cervical no se vio incrementada significativamente por efecto de la carbetocina. Sin embargo, se observó una tendencia a que las ovejas tratadas con carbetocina produjeran moco cervical que permite mayores penetrabilidades espermáticas a las 48 horas (momento de una IA IC) en relación con el moco de las ovejas no tratadas, aspecto que amerita ser investigado.

En el experimento realizado con merino dohne se acepta parcialmente la hipótesis, dado que las ovejas tratadas con carbetocina incrementaron la penetración cervical, prolificidad y la concentración de PGE<sub>2</sub> en el moco cervical en la IA con la técnica intrauterina. Sin embargo, no se vio un aumento en la fertilidad.

### 4.2. Merino australiano

La sincronización de los estros en la mayoría de las ovejas no presentó problemas y estuvo dentro de los valores esperados. Las ovejas presentaron valores promedio para inicio del estro de  $50,8 \pm 14,43$  y  $49,8 \pm 11,64$  horas, grupos control y carbetocina, respectivamente. Estos valores son similares a los reportados por Fierro et al. (2016); sin embargo, presentan el doble de la variación comunicada por el autor. El rango entre el primer y último estro detectado (20-68 horas posretiro de las esponjas) fue muy parecido a los resultados sincronizando con 2 dosis de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  (Olivera-Muzante et al., 2020). Y, si bien es algo más amplio, no difiere mucho de las 36 y 60 horas posretiro de esponjas y eCG (Gibbons et al., 2019), tal cual se utilizó en este experimento. Las concentraciones de P4 en 29 de las 30 ovejas del

experimento presentaron valores promedio para el período entre las 36 y 66 horas posretiro de las esponjas, acorde a los reportados para similar período (Menegatos et al., 2003). Se observó que 8 de las 30 ovejas estudiadas no fueron marcadas por los capones androgenizados; en una de las ovejas del grupo control se determinó una concentración de P4 similar a la producida por un cuerpo lúteo funcional (Menegatos et al., 2003; Sheldrick y Flint, 1981; Susmel y Piasentier, 1992) y fue eliminada del análisis. Una de las 4 ovejas del grupo control y 3 de las 4 ovejas del grupo carbetocina que no habían manifestado estro presentaron un perfil de E2 similar al de las ovejas que fueron marcadas en estro entorno a las 48 horas posretiro de las esponjas. Cuando en la eco 1 se estudió el número de ovejas con folículos potencialmente ovulatorios con diámetros mayor o igual que 5 mm (Scaramuzzi et al., 2011), no existieron diferencias entre los grupos control = 9/15 y carbetocina = 8/15). Estos valores concuerdan con el diámetro reportado en ovejas no prolíficas en la etapa del proestro (Bartlewski et al., 2011), por lo que no queda muy claro que la falla en la detección del estro tenga que ver con aspectos de la sincronización de las ovejas. Esto lleva a considerar que el problema pudo haber estado estado vinculado a otros aspectos y no al protocolo de sincronización de las ovejas. El protocolo de androgenización de los capones utilizado ha sido probado en reiteradas ocasiones sin reporte de problemas (Fierro et al., 2011; Maddison et al., 2016; Olivera-Muzante et al., 2020), por lo que se sospecha que al inicio del período las ovejas pueden haber quedado bien marcadas y al final no, producto del agotamiento de la pintura utilizada. Por lo anteriormente expresado, se considera que la sincronización fue adecuada en al menos 27 de las 30 ovejas involucradas en el experimento.

No se encontraron diferencias en la TO de las ovejas pertenecientes a los grupos control y carbetocina: posiblemente el bajo número de animales puede haber condicionando el resultado. El estudio de esta característica requiere evaluar un número mayor de animales, por lo menos 4 veces

superior al utilizado en este experimento por cada grupo evaluado para detectar variaciones entre un 6 % y un 30 % (King y Coetzer, 1996; Olivera-Muzante et al., 2020; Van Lier et al., 2017). Por lo tanto, no es posible sacar conclusiones respecto al tema porque el número de ovejas utilizado en el experimento no permite detectar variaciones en tasa ovulatoria.

Las penetraciones cervicales obtenidas en el experimento con merino australiano equivaldrían a penetrar el 20 % de largo total del cérvix de una oveja múltipara merino australiano (Eppleston et al., 1994), similar a la utilizada en este experimento. Los valores obtenidos en este experimento son similares a las penetraciones cervicales reportadas durante una IA con semen congelado en estro natural y en estro natural presincronizados en ovejas de 3 a 7 años de la raza corriedale, donde en un 75 % y 85 % de las ovejas no logró penetrarse más de 2 cm (Gil et al., 2002, 2003). Los valores obtenidos fueron inferiores a los observados en las ovejas merino australiano (Eppleston et al., 1994) y en ovejas carniceras (Falchi et al., 2012). Sin embargo, similar a otros estudios, las penetraciones fueron aumentando desde las 36 hasta las 54 horas, momento en que se registraron las máximas penetraciones cervicales (Falchi et al., 2012; Casuriaga, 2019). Por lo tanto, la penetración cervical no fue modificada por la carbetocina y no difirió con respecto a otros experimentos nacionales donde se utilizó la raza corriedale que comparte al menos un 50 % de su origen vinculado al merino australiano (Brash et al., 1994).

La penetrabilidad espermática obtenida en el grupo carbetocina a las 48 horas podría estar explicada por una mayor concentración de proteína en el moco cervical del grupo control en relación con el grupo carbetocina. Una mayor concentración de proteína aumenta la viscosidad del moco y el avance de los espermatozoides mejora en medios menos viscosos (Ishijima et al., 1986). La concentración de proteínas (mucina) en el moco cervical puede aumentar frente a una mayor concentración de E2 (Rexroad y Barb,

1977), y dado que los procesos de síntesis de proteína requieren de tiempo, el resultado del moco obtenido a las 48 horas podría estar explicado por el nivel de E2 registrado previamente. Por lo tanto, observar los valores de E2 en sangre en las ovejas de las que se colectó moco a las 36 y 48 horas podría dar información al respecto. En este experimento no existió diferencia en la concentración de E2 entre grupos a las horas mencionadas.

#### **4.3. Merino dohne**

Respecto a la técnica de inseminación, los resultados reflejaron la superioridad de la técnica IU y la carbetocina no mejoró la técnica IC. Se confirma que la técnica IU logra una mayor fertilidad frente a la técnica IC (King et al., 2004; Neves et al., 2008). La baja fertilidad lograda en la IA IC puede haberse debido a que la penetración cervical alcanzada no fue de una magnitud suficiente para lograr una mejoría (Eppleston et al., 1994). Si se logra la deposición del semen IU, se mejora la fertilidad en comparación con la deposición cervical profunda (entre 1 y 3 cm) y esta es mejor que la deposición cervical superficial (menos de 1 cm) (Eppleston et al., 1994). Sin embargo, en este experimento (tabla 2) se registraron valores de fertilidad que están por debajo a los descritos en la bibliografía (Salamon y Maxwell, 2000) con base en las clases de penetraciones establecidas. Los valores obtenidos en nuestro experimento son similares a las penetraciones cervicales reportadas durante una IA con semen congelado en estro natural y en estro natural presincronizado en ovejas de 3 a 7 años (Gil et al., 2002, 2003). Sin embargo, la fertilidad (determinada como el porcentaje de no retorno al estro a los 36 días pos IA) obtenida fue de 28 % (Gil et al., 2002, 2003), algo superior a la fertilidad obtenida para el tratamiento IC de este experimento. La profundidad de penetración cervical durante el estro aumenta constantemente desde el momento de la extracción de la esponja (0 horas), hasta las 54 horas posteriores a su retiro (Falchi et al., 2012). En este experimento la IA IC se realizó a las 48 horas desde el retiro de la

esponja, teniendo en cuenta que las propiedades del moco cervical se modifican en la medida que avanzamos en el estro, específicamente cuando el moco pasa de translúcido filante a blanquecino o nuboso. A las 48 horas, las características del moco en ovejas son filante translúcido o apenas nuboso, por lo que se tendría que rever el momento para próximos experimentos.

Cuando se analizó el efecto de la carbetocina sobre la tasa ovulatoria, en el tratamiento donde se realizó IA IU el suministro de carbetocina fue a las 42 horas desde el retiro de las esponjas, 6 horas más tarde en comparación con las 36 horas del protocolo IA IC. Y, si bien los efectos de la carbetocina pueden desencadenar una actividad biológica que se mantiene por hasta 12 horas en vacas lecheras (Bajcsy et al., 2006), no conocemos reportes que orienten sobre cuál es la duración de la actividad biológica en ovinos. Este aspecto puede haber jugado un papel importante en cuanto a la sincronización entre la carbetocina y la expresión de los ROx en el epitelio del cérvix (Falchi y Scaramuzzi, 2013). Si consideramos que los mecanismos neuroendócrinos que controlan el ciclo ovárico ovino son similares en muchos casos al de los primates y las ratas (Goodman e Inskip, 2015), la carbetocina puede haber generado un efecto positivo, similar al descrito para la Ox en ratas, donde se observó un mayor reclutamiento y crecimiento de folículos preantrales (Robinson et al., 1985). La Ox inhibe en el hipotalámico la degradación de GnRH (Robinson et al., 1985); es posible que esto haya generado una mayor concentración de FSH, dado que la GnRH estimula un aumento preovulatorio de FSH (Bartlewski et al., 2011). La acción de la FSH sobre el desarrollo de un folículo para que este se vuelva ovulatorio es explicada por Scaramuzzi et al. (2011): es necesario que los folículos sincronicen su desarrollo con un período de tiempo en que el nivel de FSH supere un umbral crítico (ventana de selección).

#### 4.4. Discusión general

La hipótesis de esta investigación es parcialmente aceptada, ya que el tratamiento con carbetocina incrementó la penetración cervical en las ovejas IA IC. Al mismo tiempo se observó que la concentración de la PGE<sub>2</sub> fue mayor en el moco cervical del grupo tratado que en el del control. Sin embargo, esto no se vio asociado con un incremento de la fertilidad, pero sí en la prolificidad. La penetración cervical fue mayor en las ovejas multíparas que en las primíparas y nulíparas, pero no condujo a una mejora significativa en la fertilidad. La fertilidad y la prolificidad después de la IA IU laparoscópica fueron mayores en comparación con la IA IC.

La penetración cervical en MD difirió entre el grupo control ( $13,8 \pm 1,01$  mm) y el grupo carbetocina ( $17,4 \pm 1,03$  mm), y, si bien la penetración cervical adicional lograda es pequeña, no debe ser menospreciada. Cuando se estudió la concentración de PGE<sub>2</sub> del moco cervical colectado a las 54 horas posretiro de la esponja, se determinaron valores 4 veces superiores en el grupo carbetocina respecto al control. Este hallazgo demuestra que la carbetocina realmente incidió en los procesos involucrados en la producción de PGE<sub>2</sub>, la cual permitió un aumento en la penetración cervical medida a las 48 horas. En este experimento no se midió la penetración cervical a las 54 horas y no se sabe si esta pudiera haber sido superior a la registrada a las 48 horas; sin embargo, existen reportes que establecen que la penetración cervical aumenta hasta las 54 horas (Casuriaga, 2019; Falchi et al., 2012; Perry et al., 2010). La paridad afectó la penetración del cuello uterino, lo que confirma el aspecto descrito de que ovejas viejas (multíparas) permiten una mayor penetración cervical que las jóvenes (primíparas o nulíparas). Al mismo tiempo, este experimento es el primer reporte en establecer que haber parido una vez no es suficiente para obtener cambios en el cérvix que permitan mayores penetraciones cervicales respecto a las ovejas nulíparas. Por lo tanto, la carbetocina incidió en los procesos

involucrados en la producción de PGE<sub>2</sub>, lo que provocó un pequeño incremento en la penetración cervical medida a las 48 horas en ovejas merino dohne.

La fertilidad obtenida fue baja en la IA IC porque la cánula de inseminar no logró penetraciones lo suficientemente profundas para ver una mejora en esta variable. Cuando el semen es depositado en el cuerpo del útero, la fertilidad mejora en comparación con depositar el semen en lo profundo del cérvix (1 a 3 cm), lo cual es mejor que depositarlo en el primer anillo (menos de 1 cm) (Eppleston et al., 1994). Sin embargo, la fertilidad obtenida para la penetración cervical alcanzada en este experimento (20 %) es baja en comparación con las logradas para similares penetraciones (46 %, Salamon y Maxwell, 2000; 28 %, Gil et al., 2002, 2003). Es importante destacar el efecto del momento en que se midió la fertilidad (50 días pos-IATF vs. 36 días en los trabajos citados) y las razas involucradas en cada experimento. El factor raza resulta determinante en la fertilidad obtenida en IA IC con semen congelado (Olesen, 1993; Paulenz et al., 2005; Paulenz et al., 2007). La fertilidad obtenida en el grupo de IA IU confirma que la calidad seminal y la respuesta a la sincronización de las ovulaciones fueron muy buenas.

En el experimento con MD, la IA IC se realizó a las 48 horas posretiro de las esponjas, 12 horas después de la inyección de carbetocina, lo cual puede haber sido demasiado pronto para observar el efecto máximo de la hormona sobre la penetración cervical. Además, el efecto de la paridad sobre la penetración cervical fue de mayor magnitud (5,5 mm) en comparación con el obtenido entre la penetración cervical y carbetocina (3,6 mm), pero aún así no se observó ninguna mejora en la fertilidad. Si bien no existió interacción entre paridad y tratamiento, estos resultados sugieren que las ovejas multíparas podrían responder mejor a una sola inyección de carbetocina y que aproximar el momento de inyección al de la inseminación podría

aumentar la profundidad de la penetración cervical y la fertilidad, una hipótesis que debe ser probada en experimentos futuros.

El momento de la administración de la hormona en relación con las horas de la IA IU e IA IC puede haber jugado un papel importante en la sincronización entre la carbetocina y la expresión de los ROx en los folículos, lo que posiblemente conduzca a más ovulaciones múltiples. Es posible asociar el momento de llegada del semen al lugar de fecundación, el cual puede estar relacionado con el aumento en la prolificidad observada en la IA IU en comparación con IC. La alteración en las características del semen de carnero congelado-descongelado en cuanto a longevidad y acceso al sitio de fertilización (Salamon y Maxwell, 1995b) hace que el método IA IU sea más apropiado para el semen congelado (Tervit et al., 1984). Por lo tanto, el aumento en el número de folículos seleccionados para ovular estimulados por la inyección de carbetocina y el depósito más tardío del semen congelado-descongelado en el útero pueden haber promovido un incremento en la prolificidad en comparación con las ovejas IA IC no tratadas.

En el experimento con MA se observó una tendencia en la penetrabilidad espermática entre los mocos colectados a las 48 y 54 horas, registrándose penetrabilidades de  $19,4 \pm 2,34$  en relación con  $12,8 \pm 2,34$  mm en moco de ovejas no tratadas. Esto estaría indicando que fue correcto realizar la IA IC a las 48 horas y no postergarla a las 54 horas, cuando es mayor la penetración cervical, dado que podría ser un escenario más desfavorable para el transporte espermático a través de moco cervical con menor contenido de agua. Se desconoce si el aumento de penetración cervical obtenido a las 54 horas en comparación con las 48 horas podría compensar la menor penetrabilidad del moco cervical a las 54 horas; este es un aspecto que debería ser abordado en futuros experimentos. Por lo tanto, no fue suficiente la penetración cervical obtenida con la carbetocina para mejorar la

fertilidad y es posible que puedan estar influyendo aspectos del moco cervical que no fueron estudiados en el trabajo con MA.

La prolificidad aumentó en las ovejas que fueron inseminadas con la técnica IU y las ovejas tratadas con carbetocina. Este es el primer reporte en ovinos que determina que la carbetocina puede incrementar la prolificidad. El incremento en la prolificidad se debe a un aumento en la tasa ovulatoria. La carbetocina pudo haber generado un efecto positivo sobre la prolificidad, similar al descrito para la oxitocina en ratas, asociado con un mayor reclutamiento y selección de los folículos preantrales (Robinson et al., 1985). Los folículos necesitan sincronizar su desarrollo en un período de tiempo en el que el nivel de FSH supera un umbral crítico (ventana de selección) (Scaramuzzi et al., 2011). La oxitocina inhibe la degradación de GnRH en el hipotálamo (Robinson et al., 1985), lo que posiblemente generó una mayor concentración de FSH que estimuló el reclutamiento de múltiples folículos en la onda ovulatoria (Bartlewski et al., 2011). Esto puede haber jugado un papel importante en la sincronización entre la carbetocina y la expresión de los ROx en los folículos, lo que posiblemente conduzca a más ovulaciones múltiples.

Es posible que el bajo número de ovejas preñadas en la técnica IA IC esté condicionando el resultado del estudio. El bajo número de fetos contabilizados no permite captar las posibles diferencias, por lo que se cree pertinente para un futuro estudiar el efecto de la carbetocina en una IA IC utilizando semen fresco. De esta manera podría obtenerse un mayor número de ovejas gestando y un mayor número de fetos que permita estudiar esta variable sin limitantes (King y Coetzer, 1996; Olivera-Muzante et al., 2020; Van Lier et al., 2017).

## **5. Conclusiones**

Con base en los resultados obtenidos, se cuenta con evidencias suficientes para afirmar que el uso de carbetocina 12 horas antes de la IA en ovejas merino permite pequeños incrementos en la penetración cervical que no se traducen en una mejora de la fertilidad con semen congelado-descongelado. La carbetocina generó un aumento de la concentración de PGE<sub>2</sub> en el moco cervical en relación con el moco de animales no tratados; al mismo tiempo, se observa un aumento en la prolificidad en animales tratados en la técnica IU, hallazgo que permite pensar en si la carbetocina puede ser utilizada a futuro en los protocolos de IA en ovinos con esos fines. Sería conveniente continuar estudiando el efecto que la carbetocina pueda tener en la penetración cervical respecto del momento y la dosis previa a una IA IC con semen congelado-descongelado.

## 6. Bibliografía

- Aamdal, J. y Andersen, K. (1968). Fast Thawing of Semen Frozen in Straws. *Reproduction in Domestic Animals*, 3, 22-24.
- Abril-Parreño, L., Druart, X., Fair, S., Krogenaes, A. (2023). Metabolic signature of cervical mucus in ewe breeds with divergent cervical sperm transport: a focus on metabolites involved in amino acid metabolism. *Metabolomics*, (59), 1-12.  
<https://doi.org/10.1007/s11306-023-02021-x>
- Adams, N. R. y Tang, B. Y. (1979). Changes in Ovine Cervical Mucus in Response to Oestrogen Treatment. *Journals of Reproduction & Fertility*, 57: 261-266.
- Alexander, N. J. (1981). Evaluation of Male Infertility with an in Vitro Cervical Mucus Penetration Test. *Fertility and Sterility*, 36(2), 201-208.  
doi:10.1016/S0015-0282(16)45679-7
- Álvarez, M., Chamorro, C. A., Kaabi, M., Anel-López, 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(3-4), 153-159. doi:10.1016/j.anireprosci.2012.03.001
- Anilkumar, R., Devanathan, T. G., Pattabiraman, S. R. y John Edwin, M. (2001). Correlation between the Spermatozoal Characteristics and Sperm Penetration Distance in Polyacrylamide Gel and Bovine Cervical Mucus. *Theriogenology*, 55(2), 685-691.
- Atke, A. y Vilhardt, H. (1987). Uterotonic Activity and Myometrial Receptor Affinity of 1-Deamino-1-Carba-2-Tyrosine (O-Methyl)-Oxytocin. *Acta Endocrinologica*, 115(1), 155-160.
- Azzarini, M. (1992). Contribución de la tecnología reproductiva al mejoramiento genético de la especie ovina. En: Cardellino, R., Azzarini, M. (eds.), 2.º *Seminario sobre Mejoramiento Genético en Lanares* (pp.185-195). Secretariado Uruguayo de la Lana.

- Baird, D. T. (1984). The Ovary. In Austin CR, Short RV (eds.) *Reproduction in Mammals*, 2<sup>nd</sup> Edition. Book 4. Reproductive fitness. Cambridge University Press, 256p.
- Bajcsy, Á. C., Szenci, O., van der Weijden, G. C., Doornenbal, A., Maassen, A., Bartyik, J. y Taverne, M. A. (2006). The Effect of a Single Oxytocin or Carbetocin Treatment on Uterine Contractility in Early Postpartum Dairy Cows. *Theriogenology*, 65(2), 400-414.  
doi:10.1016/j.theriogenology.2005.05.040
- Bartlewski, P. M., Baby, T. E. y Giffin, J. L. (2011). Reproductive Cycles in Sheep. *Animal Reproduction Science*, 124(3-4),259-268.  
doi:10.1016/j.anireprosci.2011.02.024
- Bartlewski, P. M. y Candappa, B. R. (2015). Assessing the Usefulness of Prostaglandin E2 (Cervidil) for Transcervical Artificial Insemination in Ewes. *Theriogenology*, 84(9),1594-1602. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.08.007
- Brash, L. D., Fogarty, N. M. y Gilmour, A. R. (1994). Genetic Parameters for Australian Maternal and Dual-Purpose Meatsheep Breeds. II. Liveweight, Wool and Reproduction in Corriedale Sheep. *Australian Journal of Agricultural Research*, 45(2),469-480.
- Campbell, B. K., Dobson, H., Baird, D. T. y Scaramuzzi, R. J. (1999). Examination of the Relative Role of FSH and LH in the Mechanism of Ovulatory Follicle Selection in Sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*, 117(2), 355-367.  
doi:10.1530/jrf.0.1170355
- Candappa, I. B. R., Bainbridge, H. C., Price, N. T., Hourigan, K. R. y Bartlewski, P. W. (2009). A Preliminary Study on the Suitability of Cervidil® to Induce Cervical Dilation for Artificial Insemination in Ewes. *Research in Veterinary Science*, 87(2), 204-206. doi:10.1016/j.rvsc.2009.02.004
- Casali, R., Pinczak, A., Cuadro, F., Guillen-Muñoz, J. M., Mezzalana, A. y Menchaca, A. (2017). Semen Deposition by Cervical, Transcervical and Intrauterine Route for Fixed-Time Artificial Insemination (FTAI) in the Ewe. *Theriogenology*, 103, 30-35. doi:10.1016/j.theriogenology.2017.07.021

- Casuriaga, D. (2019). *Dilatación cervical en la oveja: efectos de tratamientos con análogos de oxitocina y de prostaglandina E2 de larga acción* [tesis de maestría, Universidad de la República]. Colibri.  
<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/35830/1/FV-33828.pdf>
- Croy, B. A., Prudencio, J., Minhas, K., Ashkar, A. A., Galligan, C., Foster, R. A., Buckrell, B. y Coomber, B. L. (1999). A Preliminary Study on the Usefulness of Huil-8 in Cervical Relaxation of the Ewe for Artificial Insemination and for Embryo Transfer. *Theriogenology*, 52(99), 271-287.
- DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias). (2015). *Anuario Estadístico Agropecuario*. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Montevideo, Uruguay. <https://www2.mgap.gub.uy/DieaAnterior/Anuario2015/DIEA-Anuario2015-01web.pdf>
- DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias). (2019). *Anuario Estadístico Agropecuario*. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Montevideo, Uruguay. <https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2019/Anuario2019.pdf>
- DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias). (2022). *Anuario Estadístico Agropecuario*. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Montevideo, Uruguay.  
[https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2022/O\\_MGAP\\_Anuario\\_estad%C3%ADstico\\_%202022-DIGITAL.pdf](https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2022/O_MGAP_Anuario_estad%C3%ADstico_%202022-DIGITAL.pdf)
- Donovan, A., Hanrahan, J. P., Kummer, E., Duffy, P. y Boland, M. P. (2004). Fertility in the Ewe Following Cervical Insemination with Fresh or Frozen-Thawed Semen at a Natural or Synchronised Oestrus. *Animal Reproduction Science*, 84(3-4), 359–368. doi:10.1016/j.anireprosci.2003.12.014
- Dorniak, P., Bazer, F. W., Wu, G. y Spencer, T. E. (2012). Conceptus-Derived Prostaglandins Regulate Endometrial Function in Sheep. *Biology of Reproduction*, 87(1), 1-7. doi:10.1095/biolreprod.112.100487
- Dos Santos, V. M. B., Pinto, P. H. N., Balaro, M. F. A., Santos, J. D. R., Taira, A. R., do Espírito Santo, C. G., Gonçalves, F. M., da Fonseca, J. F. y Brandão, F.

- Z. (2020). Use of Oxytocin to Attain Cervical Dilation for Transcervical Embryo Transfer in Sheep. *Reproduction in Domestic Animals*, 55(10), 1446-1454. doi:10.1111/rda.13795
- Driancourt, M. A.(2001). Regulation of Ovarian Follicular Dynamics in Farm Animals. Implications for Manipulation of Reproduction. *Theriogenology*, 55(6), 1211-1239.
- Druart, X. (2012). Sperm Interaction with the Female Reproductive Tract. *Reproduction Domestic Animals*, 47(4), 348-352.  
doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.02097.x
- Dun, R. B. (1955). The Cervix Op the Ewe –Its Importance in Artificial Insemination of Sheep. *Australian Veterinary Journal*, 31(4), 101-103.
- Eppleston, J., Salamon, S., Moore, N. W. 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.
- Evans, A. C. O., Duffy, P., Hynes, N. y Boland, M. P. (2000). Waves of Follicle Development during the Estrous Cycle in Sheep. *Theriogenology*, 53, 699-715.
- Evans, G. (1988). Current Topics in Artificial Insemination of Sheep. *Australian Journal of Biological Sciences*, 41(1), 103-16.
- 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(2), 376-84.  
doi:10.1016/j.theriogenology.2012.02.017
- Falchi, L. y Scaramuzzi, R. J. (2013). The Expression of ER $\alpha$ , OTR, CPLA2, COX-2, and PPAR $\gamma$  in the Cervix of the Ewe during the Estrous Cycle. *Theriogenology*, 79(1), 40-47. doi:10.1016/j.theriogenology.2012.09.006
- Falchi, L. y Scaramuzzi, R. J. (2015). An Invitro Investigation of the Actions of Reproductive Hormones on the Cervix of the Ewe in the Follicular Stage: The Effects of 17 $\beta$ -Estradiol, Oxytocin, FSH, and Arachidonic Acid on the

- Cervical Pathway for the Synthesis of Prostaglandin E2. *Theriogenology*, 83(6), 1007-1014. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.12.003
- Fernández-Abella, D., Saldanha, S., Surraco, L., Villegas, N., Hernandez, Z. y Rodríguez Palma, R. (1996). Evaluación de La Variación Estacional de La Actividad Sexual y Crecimiento de Lana de Cuatro Razas Ovinas. II Crecimiento de lana. En: Verde, L., Castrillejo, A., Petrocelli, H., Rodríguez, A., Villalba, J., Kremer, R.(eds.), *Primer congreso uruguayode producción animal*.300p.Facultad de Agonomía.
- Fierro, S., Olivera-Muzante, J., Gil, J. y Viñoles, C. (2011). Effects of Prostaglandin Administration on Ovarian Follicular Dynamics, Conception, Prolificacy, and Fecundity in Sheep. *Theriogenology*, 76(4), 630-639. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.03.016
- Fierro, S., Viñoles, C. y Olivera-Muzante, J. (2016). Concentrations of Steroid Hormones, Estrous, Ovarian and Reproductive Responses in Sheep Estrous Synchronized with Different Prostaglandin-Based Protocols. *Animal Reproduction Science*, 167, 74-82. doi:10.1016/j.anireprosci.2016.02.009
- Figueira, L. M., Alves, N. G., Gonçalves, Souza-Fafjan, J. M., Vergani, G. B., Oliveira, M.E., Ribeiro de Lima, R. y Fonseca, J. F. (2020). Ultrasonographic Cervical Evaluation: A Tool to Select Ewes for Non-Surgical Embryo Recovery. *Reproduction in Domestic Animals*, 55(11),1638-1645. doi:10.1111/rda.13825
- Flint, A. P. F., Lamming, G. E., Stewart, H. J. y Abayasekara, D. R. E. (1994). The Role of the Endometrial Oxytocin Receptor in Determining the Length of the Sterile Oestrous Cycle and Ensuring Maintenance of Luteal Function in Early Pregnancy in Ruminants. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 344(1309), 291-304.
- Fonseca, J. F., Gonçalves, Souza-Fafjan, J. M., Oliveira, M. E., 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(1), 144-151. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.04.025

- Fuchs, A. R., Graddy, L. G., Kowalski, A. A. y Fields, M. J. (2002). Oxytocin Induces PGE2 Release from Bovine Cervical Mucosa in Vivo. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 70(1-2), 119-129. doi:10.1016/s0090-6980(02)00017-5
- Fukui, Y. y Roberts, E. M. (1978). Further Studies on Non-Surgical Intrauterine Technique for Artificial Insemination in the Ewe. *Theriogenology*, 10(5), 381-393.
- Gibbons, A. E., Fernández, J., Bruno-Galarraga, M. M., Spinelli, M. V. y Cueto, M. I. (2019). Technical Recommendations for Artificial Insemination in Sheep. *Animal Reproduction*, 16(4), 803-809. doi:10.21451/1984-3143-AR2018-0129
- Gil, J., Rodríguez-Iraozqui, M., Söderquist, L. y Rodríguez-Martínez, H. (2002). Influence of Centrifugation or Low Extension Rates Prefreezing on the Fertility of Ram Semen after Cervical Insemination. *Theriogenology*, 57(7), 1781-1792. doi:10.1016/S0093-691X(02)00652-0
- Gil, J., Rodríguez-Iraozqui, M., Lundeheim, N., Söderquist, L. y Rodríguez-Martínez, H. (2003). Fertility of Ram Semen Frozen in Bioexcell® and Used for Cervical Artificial Insemination. *Theriogenology*, 59(5-6), 1157-1170. doi:10.1016/S0093-691X(02)01178-0
- Gil, J., Fierro, S. y Bielli, A. (2005). Efecto de la oxitocina y vía de administración sobre la penetrabilidad del cérvix en oveja. En *Jornadas Uruguayas de Buiatría* (XXXIII, 2005, Paysandú, Uruguay). Jornadas Uruguayas de Buiatría. Uruguay. 186-187.
- Gómez, M. R. y Ferreira, G. (2011). Productores ganaderos. En: Gómez MR, Ferreira G, Albín A (eds.) *Características de los sistemas de producción familiar en el área de alrededores de Tacuarembó*. Montevideo. INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria). Serie Técnica; 195. 15-47.
- Goodman, R. L. y Inskip, E. K. (2015). Control of the Ovarian Cycle of the Sheep. In: Plant, T. M., Zeleznik, A. J. (eds.) *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Ed. Elsevier 4<sup>th</sup> ed. 1259-1305.

- Halbert, G. W., Dobson, H., Walton, J. S. y Buckrell, B. (1990a). A Technique for Transcervical Intrauterine Insemination of Ewes. *Theriogenology*, 33(5), 993-1010.
- Halbert, G. W., Dobson, H., Walton, J. S., Sharpe, P. y Buckrell, B. C. (1990b). Field Evaluation of a Technique for Transcervical Intrauterine Insemination of Ewes. *Theriogenology*, 33(6), 1231-1243.
- Halbert, G. W., Dobson, H., Walton, J. S. y Buckrell, B. (1990c). The Structure of the Cervical Canal of the Ewe. *Theriogenology*, 33(5), 977-992.
- Hansel, W., Cocannon, P. y Lukaszewska, J. H. (1973). Corporal Luteal of the Large Domestic Animals. *Biology of Reproduction*, 8: 222-245.
- Heap, R. B. y Flint, A. P. F. (1984). Pregnancy. In: Austin CR, Short RV (eds.) *Reproduction in Mammals*, 2<sup>nd</sup> Edition. Book 4. Reproductive fitness. Cambridge University Press, 256p.
- Ishijima, S., Oshio, S. y Mohri, H. (1986). Flagellar Movement of Human Spermatozoa. *Gamete Research*, 13, 185-197.
- Jeffries, B. C. (1961). Body Condition Scoring and Its Use in Management. *Tasmanian Journal of Agriculture*, 32, 19-21.
- 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(8): 1876-1883. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.04.039
- Karsch, F. J. (1984). The Hypothalamus and Anterior Pituitary Gland. In: Austin CR, Short RV (eds.) *Reproduction in Mammals*, 2<sup>nd</sup> Edition. Book 4. Reproductive fitness. Cambridge University Press, 256p.
- 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(5), 1225-1235. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.02.017
- Kershaw, C. M., Scaramuzzi, R. J., McGowan, M. R., Pitsillides, A. A., Wheeler-Jones, C. P. D. y Khalid, M. (2010). The Effect of Estradiol on COX-2, EP<sub>2</sub>,

and EP<sub>4</sub> mRNA Expression and the Extracellular Matrix in the Cervix of the Hypogonadotropic, Ovariectomized Ewe. *Theriogenology*, 73(5), 620-628. doi:10.1016/j.theriogenology.2009.10.018

- Khalifa, R. M., Sayre, B. L. y Lewis, G. S. (1992). Exogenous Oxytocin Dilates the Cervix in Ewes. *Journal of Animal Science*, 70(1), 38-42.
- King, M. E., McKelvey, W. A. C., Dingwall, W. S., Matthews, K. P., Gebbie, F. E., Mylne, M. J. A., Stewart, E. y 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(7), 1236-1244. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.01.009
- King, P. R. y Coetzer, W. A. (1996). Effect of Oxytocin Treatment during Oestrus on the Ovulation Rate of Merino Ewes. *Journal of the South African Veterinary Association*, 67: 42-43.
- King, P. R. y Coetzer, W. A. (1997). The Effect of Treatment with a Slow-Releasing Oxytocin Preparation at the Onset of Oestrus on the Ovulation Rate of Merino Ewes. *Journal of the South African Veterinary Association*, 68 (January): 16-17.
- Land, R. B. (1970). A Relationship between the Duration of Oestrus, Ovulation Rate and Litter Size of Sheep. *Journal of reproduction and fertility*, 23(1), 49-53.
- Leethongdee, S., Khalid, M. y Scaramuzzi, R. J. (2016). The Effect of the Intracervical Administration of FSH or LH on the Levels of Hyaluronan, COX2, and COX2 MRNA in the Cervix of the Nonpregnant Ewe. *Theriogenology*, 86(9), 2244-53. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.07.014
- Maddison, J. W., Rickard, J. P., Mooney, E., Bernecic, N. C., Soleilhavoup, C., Tsikis, G., Druart, X., Leahy, T. y de Graaf, S. (2016). Oestrus Synchronisation and Superovulation Alter the Production and Biochemical Constituents of Ovine Cervicovaginal Mucus. *Animal Reproduction Science*, 172, 114-122. doi:10.1016/j.anireprosci.2016.07.008
- Maddison, J. W., Rickard, J. P., Bernecic, N. C., Tsikis, G., Soleilhavoup, C., Labas, V., Combes-Soia, L., Harichaux, G., Druart, X., Leahy, T. y de Graaf

- S. (2017). Oestrus Synchronisation and Superovulation Alter the Cervicovaginal Mucus Proteome of the Ewe. *Journal of Proteomics*, 155: 1-10. doi:10.1016/j.jprot.2017.01.007
- Manes, J., Ríos, G., Fiorentino, M. A. y Ungerfeld, R. (2016). Vaginal Mucus from Ewes Treated with Progestogen Sponges Affects Quality of Ram Spermatozoa. *Theriogenology*, 85(5), 856-861.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.10.033>
- Martin, G. B., Rodger, J. y Blanche, D. (2004). Nutritional and Environmental Effects on Reproduction in Small Ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*, 16(4), 491-501.
- Maxwell, W. M. C. (1986). Artificial Insemination of Ewes with Frozen-Thawed Semen at a Synchronised Oestrus. 1. Effect of Time of Onset of Oestrus, Ovulation and Insemination on Fertility. *Animal Reproduction Science*, 10,301-308.
- Maxwell, W. M. C., Butler, L. G. y Wilson, H. R. (1984). Intra-Uterine Insemination of Ewes with Frozen Semen. *The Journal of Agricultural Science*, 102(1), 233-235.
- Maxwell, W. M. C. y Hewitt, L. J. (1986). A Comparison of Vaginal, Cervical and Intrauterine Insemination of Sheep. *The Journal of Agricultural Science*, 106(1), 191-193.
- Maxwell, W. M. C. y Watson, P. F. (1996). Recent Progress in the Preservation of Ram Semen. *Animal Reproduction Science*, 42(1996), 55-65.
- Menchaca, A., Miller, V., Gil, J., Pinczak, A., Laca, M. y Rubianes, E. (2004). Prostaglandin F2 $\alpha$  Treatment Associated with Timed Artificial Insemination in Ewes. *Reproduction in Domestic Animals*, 39(5),352-355.
- Menchaca, A. y Rubianes, E. (2004). New Treatments Associated with Timed Artificial Insemination in Small Ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*, 16(4), 403-413.
- Menegatos, J., Chadio, S., Kalogiannis, T., Kouskoura, T. y Kouimtzis, S. (2003). Endocrine Events during the Peri-estrous Period and the Subsequent Estrous

- Cycle in Ewes after Estrus Synchronization. *Theriogenology*, 59(7), 1533-1543. doi:10.1016/S0093-691X(02)01205-0
- Moré, J. (1984). Anatomy and histology of the cervix uteri of the Ewe: New Insights. *Acta Anat (Basel)*, 120: 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(3-4), 337-344.
- Neves, J. P., Nunes, J. F., Moraes, J. C. F., Souza, C. J. H., Salgueiro, C. C. M. y Almeida, J. L. (2008). Inseminação artificial em pequenos ruminantes. En Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. 2.<sup>a</sup> ed. São Paulo: Ed. Roca. 395p.
- Olesen, I. (1993). Effects of Cervical Insemination with Frozen Semen on Fertility and Litter Size of Norwegian Sheep. *Livestock Production Science*, 37(1-2): 169–184.
- Olivera-Muzante, J., Fierro, S. y Minteguiaga, M. A. (2020). Long Interval Prostaglandin-Based Treatment Regimens Do Not Affect Ovulatory or Prolificacy Rates of Multiparous Ewes after Cervical Fixed Timed AI. *Animal Reproduction Science*, 218: 106482. doi:10.1016/j.anireprosci.2020.106482.
- Perry, K., Haresign, W., Wathes, D. C. y Khalid, M. (2010). Intracervical Application of Hyaluronan Improves Cervical Relaxation in the Ewe. *Theriogenology*, 74(9), 1685-1690. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.07.008
- Paulenz, H., Söderquist, L., Ådnøy, T., Nordstoga, A. B., Andersen Berg, K. (2005). Effect of vaginal and cervical deposition of semen on the fertility of sheep inseminated with frozen-thawed semen. *Veterinary Record*, 156, 372-375.
- Paulenz, H., Ådnøy, T., Söderquist, L. (2007). Comparison of fertility results after vaginal insemination using different thawing procedures and packages for frozen ram semen. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 49, 26. doi:10.1186/1751-0147-49-26

- Rath, W. (2009). Prevention of Postpartum Haemorrhage with the Oxytocin Analogue Carbetocin. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 147(1), 15-20. doi:10.1016/j.ejogrb.2009.06.018
- Restall, B. J. (1966). Histological Observations on the Reproductive Tract of the Ewe. *Australian Journal of Biological Sciences*, 19: 673-86.
- Rexroad, C. E. y Barb, C. R. (1977). Cervical Mucus in Estrous Ewes after Treatment with Estrogen, Progestogens and Intrauterine Devices. *Journal of Animal Science*, 44(1), 102-105.
- Richardson, L., Hanrahan, J. P., O'Hara, L., Donovan, A., Fair, S., O'Sullivan, M., Carrington, S. D., Lonergan, P. y Evans, A. C. O. (2011). Ewe Breed Differences in Fertility after Cervical AI with Frozen-Thawed Semen and Associated Differences in Sperm Penetration and Physicochemical Properties of Cervical Mucus. *Animal Reproduction Science*, 129(1-2), 37-43. doi:10.1016/j.anireprosci.2011.10.012
- Robinson, G., Evans, J. J. y Forster, M. E. (1985). Oxytocin Can Affect Follicular Development in the Adult Mouse. *Acta Endocrinologica*, 108, 273-276.
- Robinson, J. J., McKelvey, W. A. C., King, M. E., Mitchell, S. E., Mylne, M. J. A., McEvoy, T. G., Dingwall, W. S. y Williams, L. M. (2011). Traversing the Ovine Cervix - A Challenge for Cryopreserved Semen and Creative Science. *Animal*, 5(11), 1791-1804. doi:10.1017/S1751731111000978
- Rodríguez-Piñón, M., Gonzalez, R., Tasende, C., Bielli, A., Genovese, P. y 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. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.12.019
- Rodríguez-Piñón, M., Tasende, C., Casuriaga, D., Bielli, A., Genovese, P. y Garófalo, E. G. (2015). Collagen and Matrix Metalloproteinase-2 and -9 in the Ewe Cervix during the Estrous Cycle. *Theriogenology*, 84(5), 818-826. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.05.017

Rodríguez-Piñón, M. (2015). *Estudios endócrino-moleculares, histológicos y bioquímicos en el cérvix ovino durante el ciclo estral y el anestro estacional*[tesis de doctorado, Universidad de la República]. Colibri.

<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/23999/1/FV-31594.pdf>

Rodríguez, G. F., Muscari, G. J. y Condori, C. C. (2017). Comparación de Dos Modelos de pipetas de inseminación artificial en la cateterización del canal cervical de la oveja. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 28(1), 214-218. doi:10.15381/rivep.v28i1.12939

Rubianes, E. (2000). Avances en el conocimiento de la fisiología ovárica de los pequeños rumiantes y su aplicación para el manejo reproductivo. *Actas de Fisiología*, 6, 93-103.

Rubianes E, Menchaca A, Carbajal B, 2003: Response of the 1 to 5-day aged ovine corpus luteum to Prostaglandin F2a. *Anim Reprod Sci* 78, 47–55.

Salamon, S. y Maxwell, W. M. C. (1995a). Frozen Storage of Ram Semen I. Processing, Freezing, Thawing and Fertility after Cervical Insemination. *Animal Reproduction Science*, 37(3-4), 185-249.

Salamon, S. y Maxwell, W. M. C. (1995b). Frozen Storage of Ram Semen II. Causes of Low Fertility after Cervical Insemination and Methods of Improvement. *Animal Reproduction Science*, 38(1-2), 1-36.

Salamon, S. y Maxwell, W. M. C. (2000). Storage of Ram Semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1-3), 77-111.

Sayre, B. L. y Lewis, G. S. (1996). Cervical Dilatation with Exogenous Oxytocin Does Not Affect Sperm Movement into the Oviducts in Ewes. *Theriogenology*, 45(96), 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(97), 267-275.

Scaramuzzi, R. J., Baird, D. T., Campbell, B. K., Driancourt, M. A., Dupont, J., Fortune, J. E., Gilchrist, R. B., Martin, G. B., McNatty, K. P., McNeilly, A. S., Monget, P., Monniaux, D., Viñoles, C. y Webb, R. (2011). Regulation of

- Folliculogenesis and the Determination of Ovulation Rate in Ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*, 16(4),444-467.
- Senger, P. L.(2003). *Pathways to pregnancy and parturition*. Ed. Current conceptions, Inc. 2.<sup>a</sup> ed. Washington. 373p.
- Sheldrick, E. L. y Flint, A. P. F. (1981). Circulating Concentrations of Oxytocin during the Estrous Cycle and Early Pregnancy in Sheep. *Prostaglandins*, 22(4), 631-636.
- Sheldrick, E. L. y Flint, A. P. F. (1985). Endocrine Control of Uterine Oxytocin Receptors in the Ewe. *Journal of Endocrinology*, 106(2), 249-258.
- Short, R. V. (1984). Oestrous and Menstrual Cycles. En Austin, C. R., Short, R. V. (eds.) *Reproduction in Mammals*, 2<sup>nd</sup> Edition. Book 4. Reproductive fitness. Cambridge University Press, 256p.
- Smith, J. F., Parr, J., Beaumont, S., Oliver, J. E. y Upreti, G. C. (1995). Comparison of Cervical, Transcervical and Laparoscopic Insemination of Ewes with Chilled Stored and Frozen Ram Semen. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, 55: 248-250.
- Söderquist, L., Madrid-Bury, N. y Rodríguez-Martínez, H. (1997). Assessment of Ram Sperm Membrane Integrity Following Different Thawing Procedures. *Theriogenology*, 48(7), 1115-1125.
- Susmel, P. y Piasentier, E. (1992). Assessment of Pregnancy in Bergamasca Ewes by Analysis of Plasma Progesterone. *Small Ruminant Research*, 8(4), 325-332.
- Tervit, H. R., Goold, P. G., James, R. W. y Fraser, M. D. (1984). The Insemination of Sheep with Fresh or Frozen Semen. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*,44: 11-13.
- Ungerfeld, R. y Rubianes, E. (2002). Short Term Primings with Different Progestogen Intravaginal Devices (MAP, FGA and CIDR) for eCG-Estrous Induction in Anestrus Ewes. *Small Ruminant Research*, 46(1), 63-66.
- Van Lier, E., Hart, K. W., Viñoles, C., Paganoni, B. y Blache, D. (2017). Calm Merino Ewes Have a Higher Ovulation Rate and More Multiple Pregnancies

Than Nervous Ewes. *Animal*, 11(7), 1196-1202.

doi:10.1017/S1751731117000106

Viñoles, C., Forsberg, M., Banchemo, G. y Rubianes, E. (2002). Ovarian Follicular Dynamics and Endocrine Profiles in Polwarth Ewes with High and Low Body Condition. *Animal Science*, 74(3), 539-545.

Walker, S. K., Smith, D. H., Ancell, P. y Seamark, R. F. (1989). Time of Ovulation in the South Australian Merino Ewe Following Synchronization of Estrus. 2 Efficacy of GnRH treatment and its Relevance to Insemination Programs Utilizing Frozen-Thawed Semen. *Theriogenology*, 31(3), 555-564.

Zhang, Q., Wu, W. X., Brenna, J. T. y Nathanielsz, P. W. (1996). The Expression of Cytosolic Phospholipase A2 and Protglandin Endoperoxide Synthase in Ovine Maternal Uterine and Fetal Tissues during Late Gestation and Labor. *Endocrinology*, 137(9), 4010-4017.

## 7. Anexos

### 7.1. **Administration of carbetocin prior to fixed-time artificial insemination increases cervical penetration and prolificacy but not fertility when frozen-thawed semen is deposited via the cervix in ewes**

**Burton, A<sup>1,2</sup>. Van Lier, E<sup>1,2</sup>. Gil, J<sup>b</sup>.**

<sup>1</sup>Departamento de Producción Animal y Pasturas, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Avda. Garzón 780, Montevideo 12900, Uruguay.

<sup>2</sup>Estación Experimental Facultad de Agronomía Salto, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Ruta 31, km 21, Salto 50000, Uruguay.

<sup>3</sup>Laboratorio de Reproducción Animal “Dr. Alfredo Ferraris”, CENUR Litoral Norte, Facultad de Veterinaria, EEMAC, Universidad de la República, Ruta 3 km 363, Paysandú, CP 60000, Uruguay.

Corresponding author:

E-mail: [burton@fagro.edu.uy](mailto:burton@fagro.edu.uy)

### 7.1.1. Abstract

The effects of carbetocin (50 mg kg<sup>-1</sup> PV, IM), a synthetic analogue of oxytocin, will increase cervical penetration and thus improve outcomes from intrauterine fixed-time artificial insemination in Merino Dohne ewes, in which the oestrous cycles had been synchronized using a short 7-day protocol. Intrauterine AI was compared with intracervical AI, and 400 sheep nulliparous, primiparous and multiparous ewes were compared. In order to not interfere with the intrauterine technique, the cervical penetration was measured with a scaled cannula at FTAI in the IC inseminated group (n = 200). Cervical penetration was improved by carbetocin in all three parity categories. Cervical penetration was deeper in multiparous ewes than in nulliparous or primiparous ewes. Fetuses were detected and counted by ultrasound scanning, 50 days after the FTAI. Fertility was 3 fold greater with intrauterine AI (64.1%) than with intracervical AI (19.9 %; P = 0.0001). Neither carbetocin nor ewe parity affected fertility. However, the number of fetuses per pregnant ewe (prolificacy) was double with intrauterine AI compared to intracervical AI (P = 0.0346). Carbetocin doubled prolificacy (P = 0.0090), the carbetocin almost doubled (45.6 %) the prolificacy compared to control (25.6 %). It was concluded that carbetocin increased cervical penetration, without any flow-on benefits for fertility, with intracervical AI. By contrast, with intrauterine AI, the effects of carbetocin on cervical penetration were associated with greatly improved prolificacy, if not fertility.

Keywords: *Ovis aries*; cervix penetration; oxytocin analog; fertility; prolificacy

### 7.1.2. Introduction

Artificial insemination (AI) in sheep improves genetic gain [1], but reports on fertility using frozen-thawed semen deposited in the opening of the cervix (17 %) and vagina (22 %) are poor, compared to those obtained using the intrauterine route (83 %) [2-4]. This is due to the anatomy of the ewe's cervix, that presents a convoluted path with prominences and depressions in the mucosa that form two to seven eccentric rings [5,6]. These obstacles make the cervix rigid and not permeable [5,7] preventing the deposition of semen in the uterine body [6,8,9]. The age [10] of the ewe is another relevant factor. While in multiparous ewes it is difficult to find the cervical opening due to the greater number of *papillae* [11], in nulliparous ewes is almost impossible to penetrate the cervix with an insemination cannula [12]. Frozen-thawed ram semen does not maintain the characteristics of fresh semen such as longevity and access to the fertilization site [13], so its use is restricted to intrauterine (IU) AI by laparoscopy [8]. Intrauterine IA is more expensive and requires anaesthesia [3] and trained personnel [14], limiting its widespread adoption [15]. In order to improve fertility in AI with frozen-thawed semen, the IU method should be used to by-pass the limitations presented by the ewe cervix, but it increases costs and generates pain and suffering in the ewes.

A possible solution for the low fertility rates obtained by intracervical (IC) IA with frozen-thawed ram semen is to increase the penetration of the cervix [4,9,16]. Substances such as hyaluronic acid [17] and hormones such as FSH and LH [18], and oxytocin [19-21] have been used with this purpose. Oxytocin induces the synthesis of prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) in the cervical mucosa allowing dilation of the cervix [19]. During a high estrogen (E<sub>2</sub>)/progesterone (P<sub>4</sub>) ratio, which takes place 48 hours before and throughout the duration of the ewe's estrus, the synthesis and expression of oxytocin receptors (ROx) occurs [22]. In this way, oxytocin could bind to its

membrane receptor and generate, through its mediators, the contraction of smooth muscle and the modification of cervical collagen, allowing the opening of the cervical canal [22]. The use of exogenous oxytocin in ewes (single doses iv of 200 and 400 USP unit of oxytocin-United States Pharmacopeia reference standard) it allowed the transcervical passage of a cattle AI cannula into the uterus [23]. Increased prolificacy was observed in ewes treated with 48 consecutive intravenous doses of oxytocin (0.1 IU, every 30 min for 24 h at 48 h after sponge withdrawal) [24]. This has also been observed in rats, where oxytocin increased the number of follicles and corpora lutea in treated animals compared to controls [25]. The use of oxytocin is an alternative to increase the penetration of the cervix and it has been associated with an increased prolificacy in the ewe.

Carbetocin is an analog of oxytocin with greater biological activity and half-life [26] and is used for the treatment of postpartum hemorrhage in women [27]. It has a longer half-life at the receptor compartment (ROx) than oxytocin itself [26]. The use of a more potent analogue to oxytocin, such as carbetocin, might have a similar effect as oxytocin during the dilation process of the cervix in ewes, solving the problem of multiple injections. To our knowledge, there have been no studies with a large number of ewes evaluating the effects of carbetocin on fertility and prolificacy.

Therefore, our working hypothesis was that the administration of carbetocin 12 hours before FTAI using frozen thawed-semen allows a greater penetration of the cervix, increasing fertility to levels comparable with those obtained using IU AI. We also hypothesized that the response to carbetocin treatment in terms of fertility and prolificacy would be affected by the parity of the ewes. The objective of this study was to compare cervical penetration, fertility and prolificacy of nulliparous, primiparous and multiparous ewes with cervical or laparoscopic intrauterine FTAI after administration of carbetocin compared to non-treated ewes.

### 7.1.3. Materials and methods

Animal experimentation procedures were approved ethics committee on the use of animals (CEUA), protocol number 780, file number 020300-001755-18.

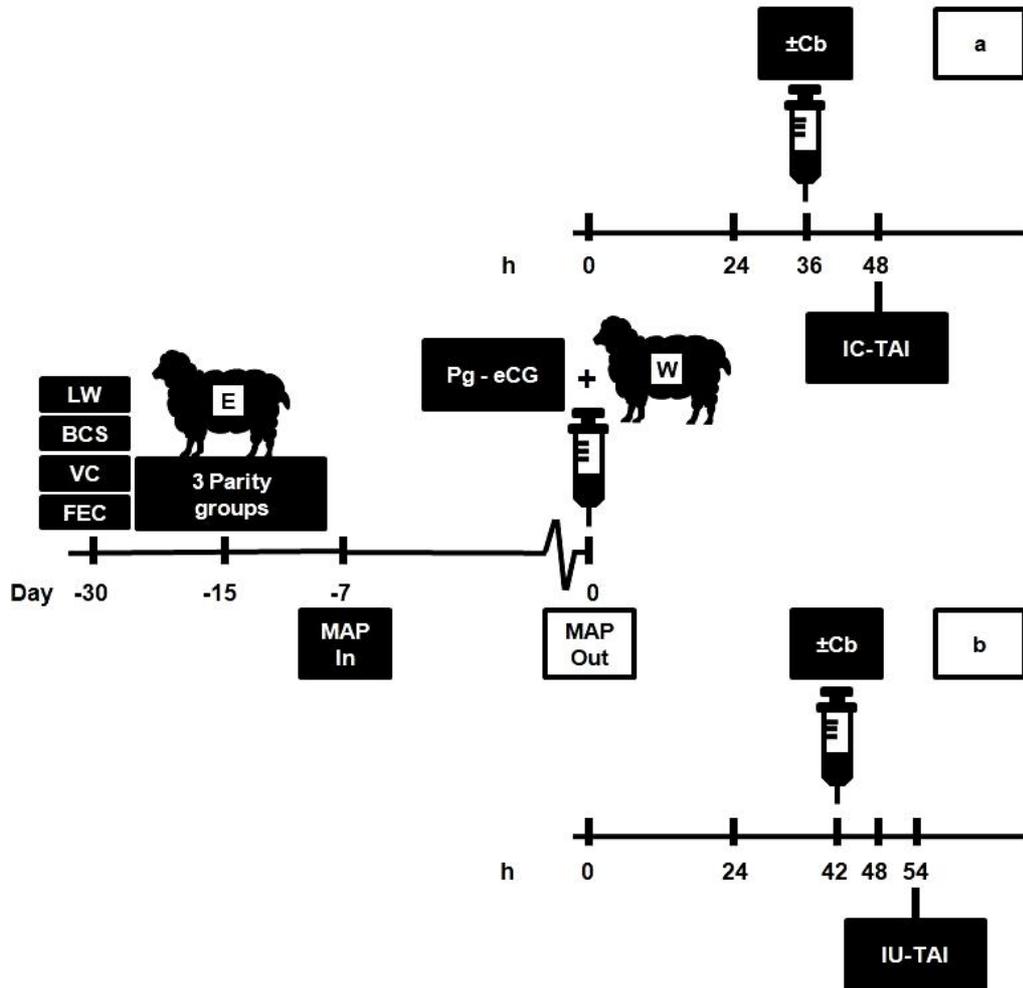
The experiment was carried out at a commercial farm (Baltasar Brum, Artigas, Uruguay) southern latitude 30°48'30.89" and western longitude 57°14'17.24". A FTAI was performed with frozen-thawed semen on 400 ewes of the Merino Dohne (MD) breed of none to five parturitions, at the beginning of March. All ewes were identified with individual tags. Live weight (LW) was determined using a 0.5 kg precision scale (Gallagher w310 v2) and body condition score (BCS) was determined on a scale of 1 to 5 [28]. Both measurements were carried out the first days of February, 15 days before the allocation of the ewes to each treatment. The experiment was a completely randomized design (factorial 2 x 2 x 3) that evaluated three fixed factors: 1) AI method with frozen-thawed semen (IC (n = 193) vs. IU (n = 197)); 2) administration of carbetocin 12 hours before FTAI (yes (n = 194) or no (n = 196)); 3) parity (nulliparous (n = 105), primiparous (n = 149), multiparous (n = 136); Figure 1). The nulliparous ewes weighed  $43.5 \pm 0.50$  (SD) kg, the primiparous ewes  $50.7 \pm 0.44$  kg and the multiparous ewes  $50.1 \pm 0.50$  kg. The BCS was  $3.0 \pm 0.02$  (SD) for the nulliparous ewes,  $3.1 \pm 0.02$  for the primiparous ewes and  $3.0 \pm 0.02$  for the multiparous ewes.

The ovulations of 400 ewes were synchronized in two batches of 200 animals. The laparoscopic IU AI and IC AI were performed less than one day apart, in order not to overlap tasks. Synchronization of ovulation was achieved using a short 7-day protocol of intravaginal MAP sponges (60 mg medroxyprogesterone acetate, laboratorio Syntex, Buenos Aires, Argentina). At the time of sponge removal, a 350 IU dose of equine chorionic gonadotropin (eCG) (Novormon ® 5000, laboratory Syntex, Buenos Aires, Argentina) and a 125 µg dose of DL-cloprostenol IM (Ciclase DL®, laboratory

Syntex, Buenos Aires, Argentina) were given (Figure 1). Androgenized wethers (n=20) were used to bio-stimulate the 400 ewes and were joined immediately after the removal of the sponges (Figure 1). The androgenization protocol of the wethers consisted of three doses of 100 mg cyclopentylpropionate per animal (Testosterona Ultra Lenta®, laboratorio Dispert, Uruguay) separated by seven days (Day -14, -7 and 0). It was treated with carbetocin (Decomoton®, laboratorio Calier, Argentina), 0.05 mg per ewe, IM 12 hours before the FTAI set for each treatment (Figure 1).

Insemination began at 48 hours after sponge removal for IC AI and at 54 hours for IU AI (Figure 1). Insemination was performed by three operators, one for the laparoscopic IU AI and two for IC insemination. Each of the operators inseminated the same number of ewes and there was no difference in cervical penetration and/or fertility between them in the IC AI. No rainfall was recorded 15 days before or after the FTAI.

Figure 1: Diagram of the time-line of the experiment performed on 400 ewes.



Note: Determination of live weight (**LW**), body condition score (**BCS**), vaccination for clostridiosis (**VC**), faecal egg count (**FEC**), separation of ewes (**E**) by treatment and parity (3 parity groups), placement of medroxy-progesterone acetate sponges (**MAP In**), removal of MAP sponges (**MAP Out**), 0.5 mL prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  (**Pg**), 1.5 mL equine chorionic gonadotropin (**eCG**), androgenised wethers (**W**). (a) Intracervical fixed time artificial insemination protocol (**IC-FTAI**) at 48 hours (**h**) from sponge removal (MAP out) performed on 200 ewes. (b) Intra uterine fixed time artificial insemination protocol (**IU-FTAI**) performed at 54 h from sponge removal (MAP out) performed on 200 ewes. IM injection or not of (50 mg kg<sup>-1</sup> PV) carbetocin (Cb) 12 h before FTAI ( $\pm$ Cb) applied to 100 ewes of each AI method.

Cervical penetration was measured with AI pipettes (Minitube, code 17300/0000, Germany), sliding a universal AI sheath for cattle out of the cannula. When placed on the external cervical orifice as a stop, it allowed measuring the depth reached by the cannula in the IC AI. When removing the cannula, the space left between the tip of the cannula and the stop presented by the plastic sheath was measured with a millimeter ruler [2].

A pool of semen from four sound rams was used, which was previously evaluated by the computer assisted sperm analysis (CASA) system. The pool was constituted at the time of insemination. The number of progressive motile sperm was 68.7 million in a volume of 0.25 mL per ewe and the mean value of vigour of the spermatozoa in the semen pool was: velocity curved line (VCL) 106.3 ( $\mu\text{m/s}$ ); curved line distance (DCL) 30.7 ( $\mu\text{m/s}$ ); average path velocity (VAP) 51.3 ( $\mu\text{m/s}$ ).

Diagnosis of pregnancy and number of fetus was assessed by ultrasonography 50 days after FTAI using an ultrasound machine (Aloka Prosound 2, Tokyo, Japan) with a trans-abdominal 3.5 MHz convex transducer. The data were used to calculate fertility (number of pregnant ewes/number of inseminated ewes x 100) and prolificacy (number of fetus/number of pregnant ewes x 100).

All animals were managed without restrictions of any kind on native pasture, with access to 12 % phosphorous salt and native pasture improved with *Lotus subbiflorus*, cultivar *El Rincón*, during the entire experimental period. One month before the beginning of the experiment, the ewes were vaccinated against clostridiosis and a coprological analysis (faecal egg count, FEC) was done.

#### 7.1.4. Statistical analysis

The data on cervical penetration (IC IA ewes only) was analyzed with a PROC GLIMMIX procedure. A model was fitted where cervical penetration was a function of the effect of the hormone (with or without carbetocin), the parity of the ewe (nulliparous, primiparous or multiparous) and the interaction between hormone and parity. The distribution of the data on cervical penetration was considered normal based on the study of the residuals. The mean comparison test (Tukey) of the fertility obtained for three classes of cervical penetration was performed.

Fertility was analyzed according to a binomial distribution with a PROC GLIMMIX procedure, considering the total of the inseminated ewes that were present at the ultrasound scan (n = 390). A model was adjusted where fertility was a function of the effect of the insemination methods (IC or IU), the hormone (with or without carbetocin) and the parity of the ewes (nulliparous, primiparous or multiparous). The prolificacy was analyzed considering the total number of fetus over the pregnant ewes, with Fisher's exact test. In order to analyze the prolificacy, it was necessary to combine the data of primiparous and multiparous ewes with fetuses.

### 7.1.5. Results

Cervical penetration (for all parity) was statistically different between the control group ( $13.8 \pm 1.01$  mm) and the carbetocin treated group ( $17.4 \pm 1.03$  mm;  $P = 0.0156$ ). Although parity affected the penetration of the cervix ( $P = 0.0012$ ; Table 1), no interaction between parity and carbetocin treatment was observed ( $P = 0.8081$ ).

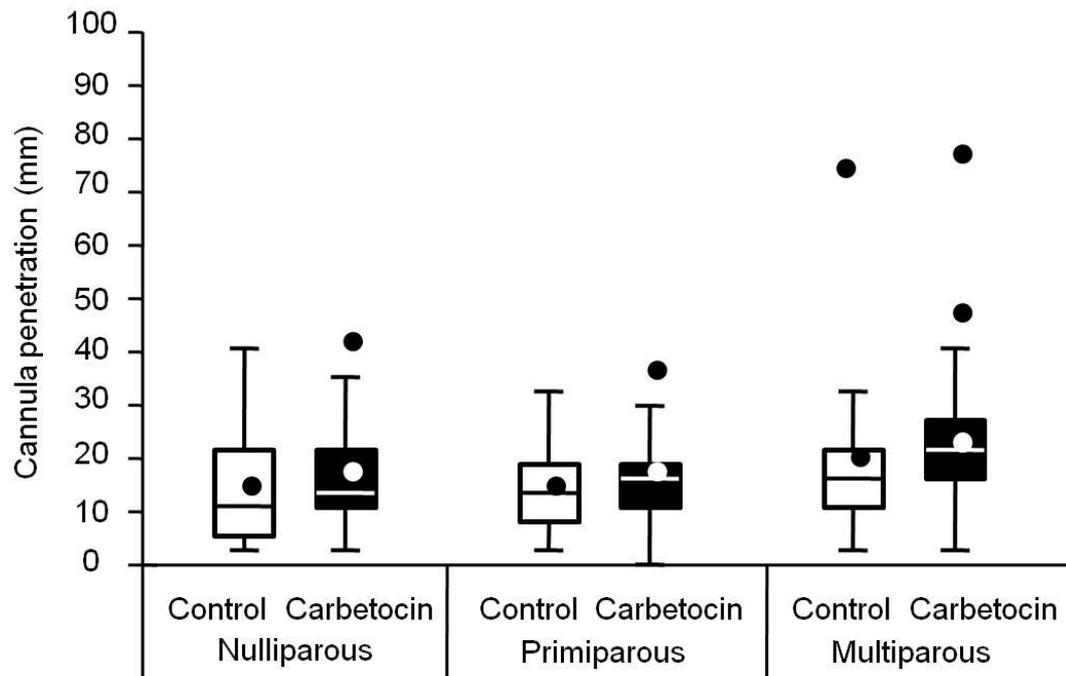
Table 1. Comparison of cervical penetration means (mm), SE, and confidence interval according to parity (nulliparous, primiparous, or multiparous) of Merino Dohne ewes.

	Nulliparous (n = 50)	Primiparous (n = 74)	Multiparous (n = 72)
Average (mm)	13.7 <b>b</b>	13.8 <b>b</b>	19.3 <b>a</b>
SE (mm)	1.41	1.60	1.80
Lower range limit (mm)	10.9	11.5	16.1
Upper range limit (mm)	16.5	16.1	21.2

Note: a, b: Different letters within the row differ ( $P < 0.05$ ).

The mean and median cervical penetration in the carbetocin group for each parity group was not significant compared to the mean and median of the control group (Figure 2:  $P > 0.1$ ).

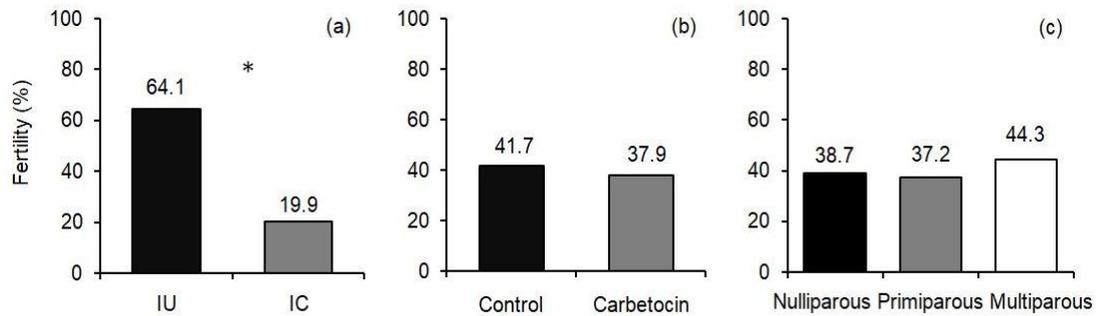
Figure 2: Cervical penetration in Merino Dohne ewes grouped according to parity without carbetocin.



Note: Mean cannula penetration of the cervix (mm) (black or white dot within the box), median, upper and lower quartiles, outlier (black dot) and standard deviation (whiskers) recorded at 48 hours from sponge removal in Merino Dohne ewes grouped according to parity without carbetocin (Control, n = 100) and treated with carbetocin (Carbetocin, n = 95).

Fertility was affected by the AI method, being three times higher with the IU compared to the IC method ( $P = 0.0001$ ; Figure 3a). Carbetocin administration had no effect on fertility ( $P = 0.4287$ ; Figure 3b), regardless of the AI method. There were no significant differences between parity groups ( $P = 0.5363$ ; Figure 3c).

Figure 3: Fertility (%).



Note: Fertility (%) according to (a) artificial insemination method (IU = intrauterine, black bar; IC = intracervical, grey bar), (b) hormonal treatment (control = without carbetocin, black bar; carbetocin = with carbetocin, grey bar) and (c) parity (nulliparous, black bar; primiparous, grey bar; and multiparous, white bar) in MD ewes. \* indicates difference between methods (<0.0001)

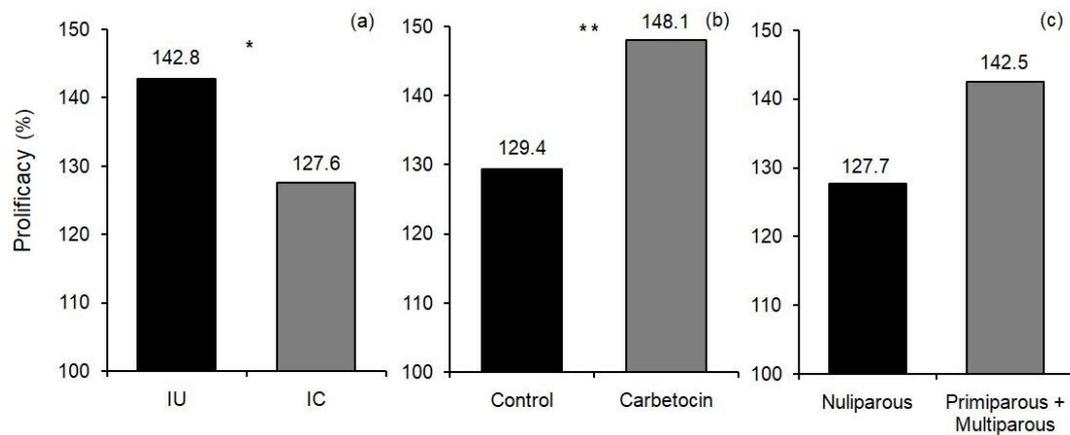
No significant differences in fertility were found when cervical penetration was grouped into three classes ( $P = 0.6077$ ; Table 2).

Table 2: Comparison of means for the percentage of fertility of cervical insemination with frozen-thawed semen for three defined classes of penetration

	Class 1 (0-10 mm) (n = 62)	Class 2 (11-20) (n = 87)	Class 3 (21-74) (n = 44)
Average	16	21	26
SE	0.05	0.04	0.06

The AI method affected the prolificacy ( $P = 0.0364$ ). The IU method almost doubled the prolificacy compared to the IC method (Figure 4a). The prolificacy in ewes from the carbetocin group 18.7 % doubled those from the control ( $P = 0.0090$ ; Figure 4b). There were no significant differences in the prolificacy considering the parity of the ewes ( $P = 0.1396$ ). However, 14.8 % more prolificacy were observed in the primiparous and multiparous compared to nulliparous ewes (Figure 4c).

Figure 4: Prolificacy (%)



Note: Prolificacy (%) according to (a) artificial insemination method (IU = intrauterine, black bar; IC = intracervical, grey bar; \* P=0.0346), (b) hormonal treatment (control = without carbetocin, black bar; carbetocin= with carbetocin, grey bar; \*\* P= 0.0090) and (c) parity (nulliparous, black bar; primiparous + multiparous, grey bar) in MD ewes.

#### 7.1.6. Discussion

The hypothesis of this study is partially accepted given that carbetocin treatment increased cervical penetration in IC AI ewes. However, it was not associated with an increase of fertility, although carbetocin promoted a significant increase in prolificacy. Cervical penetration was deeper in multiparous than in primiparous and nulliparous ewes, but it did not lead to a significant improvement in fertility. As expected, fertility and prolificacy after laparoscopic IU AI was higher compared to the IC AI [30,8].

Fertility was low in the IC AI probably because the insemination cannula could not penetrate the cervix enough to ensure an improvement. When semen is deposited in the uterus, fertility is improved compared to deep cervical deposition (between 1 and 3 cm), which is better than shallow cervical deposition (less than 1 cm) [31]. However, in this experiment, fertility values were below those described in the literature based on established penetration classes [32]. The depth of cervical penetration during oestrus increases constantly from the moment of sponge removal (0 hours) until 54 hours after sponge removal [33]. In this experiment, the IC AI was performed 48 hours after sponge removal, 12 hours after carbetocin injection, which may have been too early to observe the maximum effect of the hormone on cervical penetration. Moreover, the effect of parity (5.5 mm) on cervical penetration was of greater magnitude than that obtained with carbetocin (3.6 mm), but still no improvement on fertility was observed. These results suggest that multiparous ewes may respond better to a single injection of carbetocin, and advancing the time of its injection after sponge removal may increase the depth of cervical penetration and fertility, a hypothesis that needs to be tested in future experiments.

Prolificacy is due to an increase in ovulation rate. Carbetocin may have generated a positive effect on prolificacy, similar to that described for oxytocin in rats, associated with a greater recruitment and growth of pre-antral follicles [25]. The follicles need to synchronize their development in a period of time where the FSH level exceeds a critical threshold (selection window) [34]. Oxytocin inhibits the degradation of GnRH at the hypothalamic level [25], which possibly generated a higher concentration of FSH that stimulated the recruitment of multiple follicles into the ovulatory wave [35]. This may have played an important role in the synchronization between carbetocin and the expression of oxytocin receptors (ROx) in the follicles, possible leading to more multiple ovulations. The increase in ovulation rate observed using IU compared to the IC AI may be related to the timing of the arrival of the semen at the fertilization site. The alteration in the characteristics of frozen-thawed ram semen on longevity and access to the fertilization site [36] makes the IU AI method more appropriate for embryo yield [8]. Thus the increase in the number of follicle selected to ovulate stimulated by the injection of carbetocin and the uterine deposition on frozen-thawed ram semen may have promoted an increase in prolificacy compared to untreated IC AI ewes.

### 7.1.7. Conclusions

Cervical penetration increased with the use of carbetocin 12 hours before IC AI in ewes inseminated with frozen-thawed semen; however, fertility (with either AI method) was not affected compared to the control ewes. Furthermore, the prolificacy was higher in the ewes treated with carbetocin and inseminated directly in the uterus via laparoscopy than in the control ewes. According to the timing of oestrus and oxytocin receptor synthesis, it may be of interest to evaluate different moments of carbetocin administration prior to cervical AI.

### 7.1.8. References

1. Maxwell WMC, Hewitt LJ. A comparison of vaginal, cervical and intrauterine insemination of sheep. *J agric. Sci.* 1986;106(1):191–93.
2. Tervit HR, Goold PG, James RW. The insemination of sheep with fresh or frozen semen. *NZ Soc Anim Prod Proc.* 1984;44:11–3.
3. Evans G. Current Topics in Artificial Insemination of Sheep. *Aust J Biol Sci.* 1988;41(1):103–16.
4. Halbert GW, Dobson H, Walton JS, Buckrell BC. A technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. *Theriogenology.* 1990a;33(5):993–1010.
5. Moré J. Anatomy and histology of the cervix uteri of the Ewe: New Insights. *Acta Anat INRA Toulouse.* 1984;120:156–9. (Basel). 1984;120:156-59.
6. Kershaw CM, Khalid M, McGowan MR, Ingram K, Leethongdee S, Wax G, Scaramuzzi RJ. The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology.* 2005;64(5):1225–35.  
doi:10.1016/j.theriogenology.2005.02.017
7. Halbert GW, Dobson H, Walton JS, Buckrell BC. The structure of the cervical canal of the ewe. *Theriogenology.* 1990b;33(5):977–92.
8. Neves JP, Nunes JF, Moraes J, Souza CJH, Salgueiro CCM, Almeida JL. Inseminação Artificial em Pequenos Ruminantes. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF, editors. *Biotéc ReprodAnim.* 2nd ed. 2008, p. 395.
9. Álvarez M, Chamorro CA, Kaabi M, Anel-López L, Boixo JC, Anel E, et al. Design and “in vivo” evaluation of two adapted catheters for intrauterine transcervical insemination in sheep. *AnimReprod Sci.* 2012;131(3–4):153–59. doi:10.1016/j.anireprosci.2012.03.001
10. Kaabi M, Alvarez M, Anel E, Chamorro CA, Boixo JC, de Paz P, et al. Influence of breed and age on morphometry and depth of inseminating

- catheter penetration in the ewe cervix: A postmortem study. *Theriogenology*. 2006;66(8):1876–83.
11. Dun RB. The cervix of the ewe – Its importance in artificial insemination of sheep. *Aust Vet J*. 1955;101–3.
  12. Fukui Y, Roberts EM. Further studies on non-surgical intrauterine technique for artificial insemination in the ewe. *Theriogenology*. 1978;10(5):381–93.
  13. Salamon S, Maxwell WMC. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim Reprod Sci*. 1995a; 37(3–4): 185–249.
  14. Smith JF, Parr J, Beaumont S, Oliver JE, Upreti GC. Comparison of cervical, transcervical and laparoscopic insemination of ewes with chilled stored and frozen ram semen. *NZSoc Anim ProdProc*. 1995;55:248–50.
  15. Masoudi R, Shahneh AZ, Towhidi A, Kohram H, Akbarisharif A, Sharafi M. Fertility response of artificial insemination methods in sheep with fresh and frozen-thawed semen. *Cryobiology*. 2017;74:77–80.
  16. Casali R, Pinczak A, Cuadro F, Guillen-Muñoz JM, Mezzalira A, Menchaca A. Semen deposition by cervical, transcervical and intrauterine route for fixed-time artificial insemination (FTAI) in the ewe. *Theriogenology*. 2017;103:30–35.
  17. Perry K, Haresign W, Wathes DC, Khalid M. Intracervical application of hyaluronan improves cervical relaxation in the ewe. *Theriogenology*. 2010;74(9):1685–1690. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.07.008
  18. Leethongdee S, Khalid M, Scaramuzzi RJ. The effect of the intracervical administration of FSH or LH on the levels of hyaluronan, COX2, and COX2 mRNA in the cervix of the nonpregnant ewe. *Theriogenology*. 2016;86(9):2244–53. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.07.014
  19. Khalifa RM, Sayre BL, Lewis GS. Exogenous oxytocin dilates the cervix in ewes. *J Anim Sci*. 1992;70(1):38–42.
  20. Sayre BL, Lewis GS. Fertility and ovum fertilization rate after

- laparoscopic or transcervical intrauterine artificial insemination of oxytocin-treated ewes. *Theriogenology*. 1997;48(97):267–75.
21. Dos Santos VMB, Pinto PHN, Balaro MFA, Santos JDR, Taira AR, do Espírito Santo CG, Gonçalves FM, da Fonseca JF, Brandão FZ. Use of oxytocin to attain cervical dilation for transcervical embryo transfer in sheep. *Reprod Dom Anim*. 2020;55(10):1446–54.  
doi:10.1111/rda.13795
22. Rodríguez-Piñón M. Estudios endócrino-moleculares, histológicos y bioquímicos en el cérvix ovino durante el ciclo estral y el anestro estacional. Doctoral thesis. Montevideo. Uruguay. Universidad de la República; 2015. 64 p.
23. Sayre BL, Lewis GS. Cervical dilation with exogenous oxytocin does not affect sperm movement into the oviducts in ewes. *Theriogenology*. 1996;45(96):1523–33.
24. King PR, Coetzer WA. The effect of treatment with a slow-releasing oxytocin preparation at the onset of oestrus on the ovulation rate of Merino ewes. *J S A Vet Assoc*. 1997;68(January):16–17.
25. Robinson G, Evans JJ, Forster ME. Oxytocin can affect follicular development in the adult mouse. *Acta End (Copenh)*. 1985;108:273–276.
26. Atke A, Vilhardt H. Uterotonic activity and myometrial receptor affinity of 1-deamino-1-carba-2-tyrosine(O-methyl)-oxytocin. *Acta End (Copenh)*. 1987;115(1):155–60.
27. Rath W. Prevention of postpartum haemorrhage with the oxytocin analogue carbetocin. *Euro J Obst Gyn Reprod Biol*. 2009;147(1):15–20.  
doi:10.1016/j.ejogrb.2009.06.018
28. Jeffries BC. Body condition scoring and its use in management. *Tasm J Agric*. 1961;32:19–21.
29. Gil J, Fierro S, Bielli A. Efecto de la oxitocina y vía de administración sobre la penetrabilidad del cervix en oveja. In: XXXIII Jornadas Uruguayas de Buiatría. 2005, p. 186–7.

30. King ME, McKelvey WAC, Dingwall WS, Matthews KP, Gebbie FE, Mylne MJA, Stewart E, Robinson JJ. Lambing rates and litter sizes following intrauterine or cervical insemination of frozen/thawed semen with or without oxytocin administration. *Theriogenology*. 2004; 62(7):1236–44. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.01.009
31. Eppleston J, Salamon S, Moore NW, Evans G. The depth of cervical insemination and site of intrauterine insemination and their relationship to the fertility of frozen-thawed ram semen. *Anim Reprod Sci*. 1994;36(3–4):211–25.
32. Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci*. 2000;62(1–3):77–111.
33. Falchi L, Taema M, La Clanche S, Scaramuzzi RJ. 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*. 2012;78(2):376–84. doi:10.1016/j.theriogenology.2012.02.017
34. Scaramuzzi RJ, Baird DT, Campbell BK, Driancourt MA, Dupont J, Fortune JE, Gilchrist RB, Martin GB, McNatty KP, McNeilly AS, Monget P, Monniaux D, Viñoles C, Webb R. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. *Reprod FertDev*. 2011;23(3):444–67.
35. Bartlewski PM, Baby TE, Giffin JL. Reproductive cycles in sheep. *Anim Reprod Sci*. 2011;124(3–4):259–68.
36. Salamon S, Maxwell WMC. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim Reprod Sci*. 1995b;38(1–2):1–36.