



## Sincronización de celos en ovejas y cabras con dispositivos intravaginales liberadores de progestágenos: alteraciones en ambiente vaginal y su relación con la fertilidad

*Estrous synchronization with intravaginal devices in sheep and goats: alterations in vaginal environment and its' relation with fertility*

Jorgelina Manes<sup>1</sup>, Rodolfo Ungerfeld<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Biotecnología de la Reproducción, Departamento de Producción Animal, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Balcarce, Argentina.

<sup>2</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

<sup>3</sup>Correspondencia: rungerfeld@gmail.com

### Resumen

Los dispositivos intravaginales impregnados con progesterona o progestágenos son frecuentemente utilizados para la sincronización de los celos en ovejas y cabras. Sin embargo, la fertilidad de estos tratamientos es más baja que la de una ovulación espontánea, lo que parece tener un origen multicausal. La presencia de los dispositivos en la vagina (esponjas o dispositivos de silicona) provoca cambios en el ambiente vaginal caracterizados por un incremento en el número y una alteración en la composición de la biota bacteriana además de cambios histológicos y citológicos de la pared vaginal. El crecimiento bacteriano es fundamentalmente basado en un aumento en las bacterias coliformes Gram-negativas (*E. coli* y *Klebsiella* spp.). Estas vaginitis son responsables por sí mismas de una significativa reducción en las tasas de concepción. La acumulación de productos bacterianos e inflamatorios en el entorno vaginal afecta la viabilidad espermática. Recientemente, observamos que los espermatozoides en contacto con moco vaginal de ovejas en celo sincronizado con esponjas presentan alteraciones en su funcionalidad y viabilidad. El resultado del uso de dispositivos intravaginales está condicionado no solo por la respuesta ovárica, sino también por los cambios que provoca en el ambiente vaginal normal.

**Palabras clave:** celo, ciclo estral, fertilidad, inseminación artificial, ovulación, vaginitis.

### Abstract

*Intravaginal devices impregnated with progesterone or progestagens are widely used for estrous synchronization in ewes and goats. However, due to several causes, the fertility obtained with these treatments is lower than in a spontaneous estrus. The presence of these devices in the vagina induces an increase of the vaginal biota, changes in its composition, histological and cytological alterations in the vaginal wall. The main bacterial growth is based in Gram negative coliforms (*E. coli* y *Klebsiella* spp.). An important reduction in conception rates can be achieved to vaginitis. The accumulation of bacterial and inflammatory products in the vagina affects the sperm viability. Recently we have observed that the spermatozoa functionality and viability is affected after co-incubation with vaginal mucus collected from ewes pretreated with intravaginal sponges. Overall, the results of treatments with intravaginal devices are affected by the ovarian response but also by the changes induced in the normal vaginal environment.*

**Keywords:** artificial insemination, estrous cycle, estrus, fertility, ovulation, vaginitis.

### Introducción

La sincronización de celos es una herramienta ampliamente utilizada en programas de mejoramiento genético de los sistemas de producción animal. Al mismo tiempo, el control del ciclo estral permite aumentar la eficiencia reproductiva mediante el control de la época de parición. Las técnicas farmacológicas permiten agrupar los celos de tal manera que es posible inseminar un gran número de animales en un solo día de trabajo, e incluso sin necesidad de detectar el estro. Estos tratamientos pueden ser utilizados tanto durante la estación reproductiva como durante el anestro estacional. En los ovinos, las técnicas de sincronización de celos más utilizadas incluyen el uso de dispositivos intravaginales impregnados con progesterona o progestágenos. Los primeros dispositivos de este tipo fueron desarrollados en Australia por Robinson (1956).

Entre las diferentes variantes de dispositivos liberadores de hormonas, se encuentran las esponjas de poliuretano de alta densidad, usualmente impregnadas con progestágenos sintéticos [acetato de medroxiprogesterona (MAP), acetato de fluorogestona (FGA)]. Estos son los dispositivos de elección en majadas comerciales, debido principalmente a la practicidad de uso y bajo costo. Los progestágenos se caracterizan por poseer una actividad varias veces más potente que la progesterona (Shelton, 1965), por lo que se utilizan



cantidades mucho más reducidas. Otras variantes de dispositivos intravaginales son los realizados en silicona, impregnados con progesterona, que varían en sus formas, tamaños, y número de veces que pueden ser reutilizados (CIDR, Cronipres CO, DICO).

### **Tratamientos con esponjas**

Los tratamientos tradicionales para sincronizar celos en caprinos consisten en la inserción de un dispositivo con progestágenos durante 12 a 14 días, lo que puede estar o no asociado a una dosis de prostaglandina y eCG. A partir de la incorporación de nuevos conocimientos en el área de la fisiología reproductiva se ha acortado la duración de estos tratamientos. En el caso de animales en anestro, los tratamientos aplicados durante 5-6 días son al menos tan efectivos como los tradicionales (Ungerfeld y Rubianes, 1999; Ungerfeld et al., 2003). En este caso, para obtener un alto porcentaje de animales que respondan, el tratamiento deberá asociarse a la administración de eCG al retiro del dispositivo (Ungerfeld y Rubianes, 2002) o al uso del efecto macho (Ungerfeld et al., 2003).

En animales ciclando, los tratamientos cortos requieren de una dosis de prostaglandina F2alfa para asegurar la luteólisis, y eCG al momento de retirar el dispositivo para sincronizar la ovulación y/o aumentar la tasa ovulatoria (Menchaca y Rubianes, 2004). Mediante este protocolo es posible inseminar todas las hembras en un mismo momento sin necesidad de detectar el estro, tecnología conocida como inseminación artificial a tiempo fijo o IATF. La IATF por vía cervical se realiza a las 48 y 52 h de retirar el dispositivo en ovejas y cabras respectivamente, y por vía intrauterina a las 54 h en ambas especies.

Sin embargo, la fertilidad obtenida en ovejas inseminadas luego de la sincronización de celos con progesterona o progestágenos es más baja que la de una ovulación espontánea (Robinson, 1968; Hawk et al., 1981), lo que parece tener un origen multicausal. Se producen fallas en la fertilización (Robinson, 1968), que pueden ser causadas por la ovulación de un folículo envejecido (Johnson et al., 1996), la pérdida de espermatozoides a lo largo del tracto reproductivo (Hawk y Conley, 1971), o la muerte de los espermatozoides en el cervix, útero y oviducto. Asimismo, la aplicación intravaginal en ovinos, supone un factor predisponente para las vaginitis causadas por los microorganismos oportunistas (Sargison et al., 2007).

### **Uso de dispositivos intravaginales y vaginitis**

La presencia de los diferentes dispositivos en la vagina durante el tratamiento de sincronización e inducción del estro provoca cambios en el ambiente vaginal atribuidos no sólo a su acción física sino también, en el caso de la esponja, a la constante absorción y retención de secreciones vaginales (Suárez et al., 2006). Por ello, es muy frecuente que al retirar dichos dispositivos se produzca una descarga vaginal hemorrágica, de tipo pútrido que va acompañada, en la mayoría de los casos, de un incremento del número y un cambio en la composición de la biota bacteriana presente en la vagina de las ovejas (Scudamore, 1988; Suárez et al., 2006; Manes et al., 2010) y las cabras (Manes et al., 2013) tratadas. El abundante crecimiento bacteriano observado al retiro de los dispositivos es debido principalmente a un aumento en la cantidad de bacterias coliformes Gram-negativas siendo *E. coli* y *Klebsiella* spp., las cepas aisladas con mayor frecuencia (Martins et al., 2009, 2010; Manes et al., 2010). Suárez et al. (2006) demostraron que la presencia de dispositivos intravaginales durante el tratamiento de sincronización e inducción del estro genera una reacción inflamatoria que aumenta la secreción local de mucus, con el concomitante aumento de la flora bacteriana en ovejas y en cabras (Manes et al., 2013). Este cambio en la flora bacteriana se observa al menos a los 5 días de colocados los dispositivos, junto con un manifiesto incremento en el flujo y flora bacteriana vaginal (Suárez et al., 2006). En forma similar, en cabras se observan tanto en tratamientos de sincronización de corta duración (6 días) como en los tratamientos largos (11 días) (Manes et al., 2013). Estos cambios se producen luego de la aplicación de esponjas o dispositivos de silicona (Suárez et al., 2006; Manes et al., 2010).

La flora vaginal aislada normalmente en ovejas y cabras es mayoritariamente Gram positiva, predominando las especies del género *Bacillus* spp. Al retirar los dispositivos (esponjas o dispositivos de silicona) la flora predominante cambia a Gram negativa. En ovejas prevalecieron las Enterobacterias, siendo *Escherichia* spp. la especie aislada con mayor frecuencia (Manes et al., 2010) y en cabras prevaleció *Arcanobacterium pyogenes*, acompañada en algunos casos de enterobacterias (Manes et al., 2013). No obstante, el día del estro, el número de colonias retorna a valores similares a los normales tanto en cabras (Manes et al., 2013) como en ovejas (Suárez et al., 2006). Estas alteraciones en la biota bacteriana podrían ser atribuidas a cambios en el medio ambiente vaginal generados por la presencia de los dispositivos, que favorecerían el desarrollo de enterobacterias oportunistas.

### **Cambios en histológicos y citológicos generados por el uso de los dispositivos intravaginales**

La aplicación de esponjas generó hiperplasia e hipertrofia epitelial con presencia de hemorragias e

infiltrados perivasculares (Manes et al., 2015). Se observó un incremento en el número de células epiteliales, neutrófilos, macrófagos y eritrocitos luego del retiro de las esponjas (Fig. 1A y 1B). Estos resultados coincidieron con los reportados por Suárez et al. (2006) quienes observaron la presencia de un importante número de macrófagos en el flujo vaginal luego del retiro de las esponjas. La presencia de leucocitos en el epitelio vaginal puede actuar contra los espermatozoides afectando negativamente la fertilidad del celo sincronizado. Además, durante estos procesos inflamatorios se liberan sustancias biológicamente activas, tales como radicales libres, que ejercen un efecto tóxico sobre los espermatozoides (Fraczek y Kurpisz, 2007) ya que ocasionan la peroxidación de los lípidos de la membrana espermática, alterando su integridad morfológica y movilidad (Salomon y Maxwell, 2000). Estos cambios son acompañados por una reducción de la viabilidad y del transporte espermático en el tracto reproductivo de la hembra (Salomon y Maxwell, 2000). Adicionalmente, los lipopolisacáridos de las bacterias Gram negativas han sido relacionados con infertilidad y pérdidas de embarazo en mujeres debido a la acción directa de los componentes bacterianos sobre la viabilidad y movilidad espermática (Gorga et al., 2001).

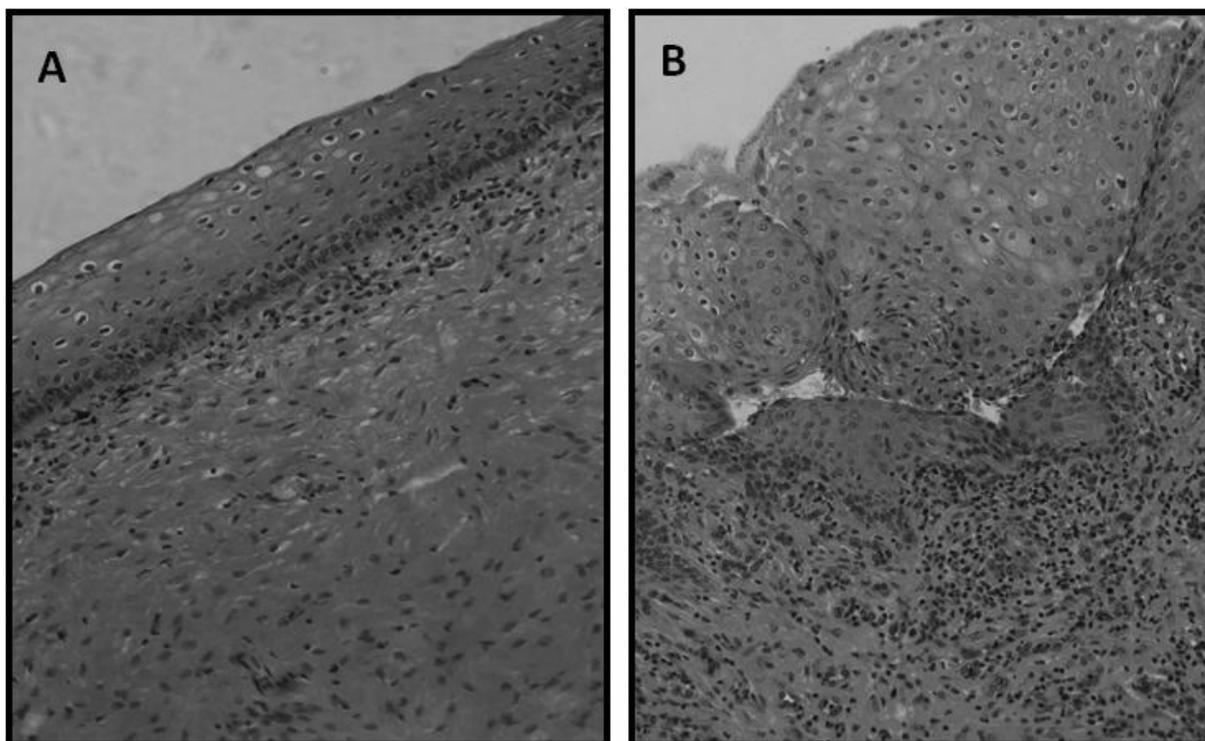


Figura 1. Microfotografía de biopsias vaginales de ovejas en anestro tratadas con esponjas intravaginales impregnadas con 60 mg de acetato de medroxiprogesterona durante 14 días (hematoxilina-eosina) A) Moderado infiltrado de linfocitos y células plasmáticas debajo del epitelio escamoso estratificado en ovejas sin tratar (20X). B) Vaginitis con hiperplasia e hipertrofia de las células epiteliales con moderado infiltrado de células plasmáticas en la lámina propia, debajo del epitelio en ovejas muestreadas el día de retiro de las esponjas (20X).

### Vaginitis y fertilidad

La progesterona y los progestágenos tienen un importante efecto inmunosupresor (Lewis, 2003; Pineda, 2003), el que sería parcialmente responsable del incremento en el número de bacterias en el útero de vacas durante el posparto temprano (Sheldon et al., 2006). Sin embargo, Gatti et al. (2011) determinaron que el crecimiento bacteriano es similar con el uso de esponjas placebo (sin MAP) o esponjas impregnadas con medroxiprogesterona. Por tanto, los posibles efectos de las vaginitis serían similares en ovejas tratadas con esponjas con o sin hormona.

Considerando que las vaginitis provocadas por el uso de esponjas pueden ser una causa de la menor fertilidad de los celos sincronizados con estos tratamientos (Robinson, 1968; Hawk et al., 1981), Manes et al. (2014) evaluaron el efecto de los cambios provocados por la aplicación de las esponjas sobre la fertilidad de los celos en ovejas cíclicas. Para ello, colocaron esponjas intravaginales impregnadas o no con progestágenos a las 48 h pos celo, de forma de generar las vaginitis durante el período anterior al celo espontáneo siguiente. A su vez, un tercer grupo permaneció como control sin tratar. Dado que las ovejas tratadas con esponjas sin hormona tendrían únicamente las vaginitis como posible efecto negativo, esto permitiría determinar si hay algún efecto deletéreo de las mismas en la fertilidad. En efecto, en este trabajo se observó una reducción de la tasa de preñez



en los grupos tratados con esponjas de más del 10%, sin que se observaran diferencias de acuerdo a la presencia o no de hormonas en las esponjas. Por tanto, los resultados de este trabajo permitieron determinar que los cambios provocados por la aplicación de las esponjas son responsables por sí mismos de una significativa reducción en la fertilidad.

Una posible explicación para esta disminución de la fertilidad es una reducción en la calidad espermática dada por un ambiente vaginal alterado que puede afectar, no sólo la composición bacteriana y las paredes vaginales sino también las características del moco cervical que los espermatozoides deben atravesar. En este sentido, recientemente observamos que los espermatozoides que atraviesan el moco cervical de ovejas en celo sincronizado con esponjas presentan alteraciones en su funcionalidad y viabilidad, efecto que no fue observado en los que tuvieron contacto con la mucosidad de las ovejas en celo espontáneo (Manes et al., 2015; INTA, Balcarce, Argentina; submetido).

### Uso de esponjas y antibioticoterapia

Suárez et al. (2006) realizaron antibiogramas con los cultivos repicados a partir del retiro de la esponjas de las ovejas, sugiriendo que la administración de oxitetraciclina podría potencialmente, controlar o disminuir las vaginitis generadas por las esponjas. En relación con ello, se evaluó el efecto del agregado de oxitetraciclina por vía parenteral o local (impregnando la esponja) sobre las cargas bacterianas generadas por el uso de las esponjas intravaginales con MAP. El tratamiento con antibiótico local resultó en un menor crecimiento bacteriano que el tratamiento con el antibiótico sistémico (Gatti et al., 2011). En contraposición, en cabras observamos que la prueba de susceptibilidad a los antibióticos mostró que la oxitetraciclina tuvo la mayor proporción de colonias resistentes (Manes et al., 2013).

### Vaginitis y atraktividad sexual

El mucus vaginal y la orina son una fuente de señales químicas vinculadas a la atraktividad sexual de las ovejas. Por ello, la alteración de la flora vaginal normal mediante la administración de antibióticos disminuyó la atraktividad sexual de las ovejas en celo (Ungerfeld y Silva, 2005). Dado que el uso de esponjas intravaginales altera la flora vaginal, esto potencialmente podría alterar la atraktividad sexual. Por ello Gatti y Ungerfeld (2012) compararon la atraktividad sexual de ovejas con celo espontáneo o con celo sincronizado con esponjas, observando que el uso de esponjas disminuye la atraktividad de las ovejas para los carneros. Más aún, estos autores observaron que la adición de antibióticos a la esponja no permite recuperar la atraktividad sexual normal.

### Conclusiones

Los resultados de los protocolos para sincronización de celos, que incluyen dispositivos intravaginales son afectados no solo por la respuesta ovárica, sino también por los cambios generados en el ambiente vaginal, los que son parcialmente responsables de la menor fertilidad obtenida con estos tratamientos. Esto último, es muy importante en especies como la oveja y la cabra, en las que debido a la anatomía del cérvix, durante la inseminación artificial el semen debe ser depositado en el fondo de la vagina.

### Referencias

- Fraczek M, Kurpisz M.** Inflammatory mediators exert toxic effects of oxidative stress on human spermatozoa. *J Androl*, v.28, p.325-333, 2007.
- Gatti M, Zunino P, Ungerfeld R.** Changes in the aerobic bacterial mucous load after treatment with intravaginal sponges in anoestrous ewes: effect of medroxyprogesterone acetate and antibiotic treatment use. *Reprod Domest Anim*, v.46, p.205-208, 2011.
- Gatti M, Ungerfeld R.** Intravaginal sponges to synchronize estrus decrease sexual attractiveness in ewes. *Theriogenology*, v.78, p.1796-1799, 2012.
- Gorga F, Galdiero M, Buommino E, Galdiero E.** Porins and lipopolysaccharide induce apoptosis in human spermatozoa. *Clin Diag Lab Immunol*, v.8, p.206-208, 2001.
- Hawk HW, Conley HH.** Loss of spermatozoa from the reproductive tract of the ewe and intensification of sperm breakage by progestagen. *J Reprod Fertil*, v.27, p.339-347, 1971.
- Hawk HW, Cooper BS, Pursell VG.** Increased sperm death in the cervix and uterus of estrous ewes after regulation of estrus with prostaglandin or progestogen. *J Anim Sci*, v.52, p.601-610, 1981.
- Johnson SK, Dailey RA, Inskip EK, Lewis PE.** Effect of peripheral concentrations of progesterone on follicular growth and fertility in ewes. *Domest Anim Endocrinol*, v.13, p.69-79, 1996.
- Lewis GS.** Steroidal regulation of uterine resistance to bacterial infection in livestock. *Reprod Biol Endocrinol*, v.1, p.117-124, 2003.



- Manes J, Campero C, Hozbor F, Alberio R, Ungerfeld, R.** Vaginal histological changes after using intravaginal sponges for oestrous synchronization in anoestrous ewes. *Reprod Domest Anim*, in press. doi: 10.1111/rda.12482, 2015.
- Manes J, Fiorentino MA, Hozbor F, Paolocchi F, Alberio R, Ungerfeld R.** Changes in the aerobic vaginal bacteria load and antimicrobial susceptibility after different oestrous synchronization treatments in goats. *Anim Prod Sci*, v.53, p.555-559, 2013.
- Manes J, Fiorentino MA, Kaiser G, Hozbor F, Alberio R, Sanchez E, Paolocchi F.** Changes in the vaginal flora after treatment with different intravaginal devices in ewes. *Small Rumin Res*, v.94, p.201-204, 2010.
- Manes J, Hozbor F, Alberio R, Ungerfeld R.** Intravaginal placebo sponge affect negatively the conception rate in sheep. *Small Rumin Res*, v.120, p.108-111, 2014.
- Martins G, Figueira L, Penna B, Brandao F, Varges R, Vasconcelos C, Lilenbaum W.** Prevalence and antimicrobial susceptibility of vaginal bacteria from ewes treated with progestin-impregnated intravaginal sponges. *Small Rumin Res*, v.81, p.182-184, 2009.
- Martins LT, Santos Neto PC, Gaudêncio Neto S, Rauber LP, Bertolini M, Vieira AD, Mezzalira A.** Microbiological and functional evaluation of an alternative device (OB®) for estrous synchronization in ewes. *Cienc Rural*, v.40, p.389-395, 2010.
- Menchaca A, Rubianes E.** New treatments associated with Timed Artificial Insemination in small ruminants. *Reprod Fertil Dev*, v.16, p.403-414, 2004.
- Pineda MH.** Female reproductive system. In: Pineda MH (Ed.). *Veterinary Endocrinology and Reproduction*. Iowa State Press, 2003. p.293-341,
- Robinson TJ.** The artificial insemination of the Merino sheep following the synchronization of oestrus and ovulation by progesterone injected alone and with Pregnant Mare Serum Gonadotrophin (PMSG). *Aust J Agric Res*, v.3, p.194-210, 1956.
- Robinson TJ.** The synchronization of the estrous cycle and fertility. In: *Internacional Congress on Animal Reproduction*, 6, 1968, Paris. Paris: ICAR, 1968. v.2, p.1347. Resumo.
- Salomon S, Maxwell WMC.** Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci*, v.62, p.77-111, 2000.
- Sargison ND, Howie F, Mearns R, Penny CD, Foster G.** Shiga toxin-producing *Escherichia coli* as a perennial cause of abortion in a closed flock of Suffolk ewes. *Vet. Rec.* v.160, p.875-876, 2007.
- Sheldon M, Lewis G, LeBlanc S, Gilbert RO.** Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology*, v.65, p.1516-1530, 2006.
- Shelton JN.** Identification of progestagens of high activity for control of the oestrus cycle in the sheep. *Nature*, v.206, p.156-158, 1965.
- Scudamore CL.** Intravaginal sponge insertion technique. *Vet Rec*, v.123, p.554, 1988. Letter.
- Suárez G, Zunino P, Carol H, Ungerfeld R.** Changes in the aerobic vaginal bacterial mucous load and assessment of the susceptibility to antibiotics after treatment with intravaginal sponges in anestrous ewes. *Small Rumin Res*, v.63, p.39-43, 2006.
- Ungerfeld R, Rubianes E.** Effectiveness of short-term progestogen priming for the induction of fertile oestrus with eCG in ewes during late seasonal anoestrus. *Anim Sci*, v.68, p.349-353, 1999.
- Ungerfeld R, Rubianes E.** Short term primings with different progestogen intravaginal devices (MAP, FGA, CIDR) for eCG-estrous induction in anestrus ewes. *Small Rumin Res*, v.46, p.63-66, 2002.
- Ungerfeld R, Silva L.** The presence of normal vaginal flora is necessary for normal sexual attractiveness of estrous ewes. *Appl Anim Behav Sci*, v.93, p.245-250, 2005.
- Ungerfeld R, Suárez G, Carbajal B, Silva L, Laca M, Forsberg M, Rubianes E.** Medroxyprogesterone primings and response to the ram effect in Corriedale ewes during the non-breeding season. *Theriogenology*, v.60, p.35-45, 2003.
-