

EFEITO DA APLICAÇÃO VAGINAL DE AGENTES DILATADORES DO CÉRVIX DURANTE A FASE FOLICULAR DO CICLO EM OVELHAS

EFFECTS OF INTRAVAGINAL APPLICATION OF CERVICAL DILATATION AGENTS DURING OESTROUS FOLLICULAR PHASE IN EWES

J.P. Barbas, S.C. Gonçalves, C.C. Marques, A.E.M. Horta

Departamento de Reprodução Animal, Estação Zootécnica Nacional -INIA, 2000-763 Vale de Santarém

RESUMO

Pretendeu avaliar-se o efeito da aplicação vaginal de agentes dilatadores do cérvix, sobre o relaxamento muscular e dilatação do colo uterino de ovelhas em estro, visando uma melhor progressão espermática após a inseminação artificial (IA). Setenta e sete ovelhas cíclicas foram submetidas a um tratamento de sincronização do estro e indução da ovulação. Em 56 ovelhas, foram utilizados os seguintes tratamentos: testemunha (n=17), o antagonista da progesterona (P4) aglépristone (n=8), um preparado comercial de ocitocina (n=7), o análogo sintético da prostaglandina E₁ (PGE₁) misoprostol (n=4), o agonista dos receptores β-adrenérgicos sulfato de terbutalina (n=6) e a associação misoprostol + terbutalina (n=14), todos eles administrados por via vaginal e depositados próximo do os cervical. Os tratamentos foram realizados 36 e 56 horas após a remoção das esponjas (REV), após o que se avaliou a penetrabilidade cervical aos 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos com um estilete. Na avaliação realizada 56 horas após REV não foram considerados os dois últimos registos.

A penetrabilidade cervical ao longo do tempo, só registou aumentos significativos entre a leitura inicial e as restantes, no grupo misoprostol + terbutalina, quer às 36 h (22,5 vs. 23, 23,4, 23,5, 23,6 e 23,6 cm, P<0,05), quer às 56 h (22,9 vs. 23,6, 24 e 24,2 cm, P<0,05). Relativamente ao grupo testemunha, o aglépristone foi único tratamento isolado que provocou um aumento significativo da penetrabilidade e somente aos 15 minutos na sessão das 36 horas (23,5 vs. 22,5 cm, P<0,05). A associação misoprostol + terbutalina apresentou aumentos significativos relativamente à testemunha, em todas as leituras com excepção da inicial, às 36 h e às 56 horas. Nos animais pertencentes aos vários grupos em estudo (n=56), não foram observadas diferenças significativas relativamente ao intervalo remoção das esponjas vaginais pico de LH, cujo intervalo médio foi de 46,13 ± 7,57 horas. O misoprostol, a terbutalina e a sua associação não afectaram as características seminais *in vitro*. O sémen tratado com misoprostol apresentou um valor médio (leituras aos 0, 30 e 60 minutos) de 59% de espermatozóides (spz) vivos e 66,3% de spz móveis, que não foram diferentes dos observados no sémen testemunha (69,2% e 66,6%, respectivamente). O tratamento do sémen com terbutalina não conduziu igualmente a diferenças significativas, quer para a % de spzs vivos (78% vs. 74,2%), quer móveis (67% vs. 65,7%). A associação dos dois fármacos (misoprostol mais terbutalina) não influenciou significativamente qualquer dos parâmetros em estudo, tendo a % média de spz vivos e a % média dos spz móveis sido de 76% e 65% no grupo tratado e de 77% e 66,3% no testemunha. Daqui concluiu-se que as drogas utilizadas são inócuas quanto às características seminais avaliadas. A associação de um β-agonista e da PGE₁ provoca um aumento da penetrabilidade cervical sem afectar as características seminais *in vitro*.

SUMMARY

This study was conducted to determine the effect of intravaginal application of cervical ripening agents on estrous sheep cervical softening and dilatation, envisaging the efficient sperm transport throughout the uterus into the oviducts after artificial insemination (IA). Seventy-seven (77) ewes were submitted to estrous synchronization treatments. Fifty-six (56) animals were then assigned to the following treatment groups: Control (n=17), progesterone antagonist aglépristone (n=8), oxytocin (n=7), synthetic prostaglandin E₁ analogous misoprostol (n=4), β-adrenergic receptor agonist terbutalin sulphate (n=6) and the association

misoprostol+terbutalin (n=14). All the products were given intravaginally into the *cervical os* at 36 and 56 hours after pessary removal (REV). Depth of cervical penetration (cm) with a graduated stainless steel rod was measured at 0, 15, 30, 60, 90 and 120 minutes after each treatment. The two last measurements at 56 hours after REV were not considered.

Depth of cervical penetration increased significantly along measurements in group misoprostol+terbutalin, either at 36 hours (22.5 vs. 23, 23.4, 23.5, 23.6 and 23.6 cm; $P < 0,05$) or 56 hours (22,9 vs. 23,6, 24 and 24,2 cm, $P < 0,05$) post REV. At 36 hours post REV, aglépristone group showed significantly higher values of cervical penetration at 15 minutes than control (23,5 vs. 22,5 cm; $P < 0,05$). Except at 0 minutes, misoprostol+terbutalin treatment either at 36 or 56 hours after REV significantly induced deeper cervical penetration than control group. There were no significant differences in the interval from REV to LH surge among all groups (46.13 ± 7.57 hours). Neither misoprostol, terbutalin or their association affected *in vitro* sperm characteristics. Sperm treated with misoprostol presented live sperm (59%) and motility (66.3%) rates not significantly different from control group (69.2 and 66.6%, respectively). Treatment with terbutalin did not affect live sperm (78 vs. 74.2% in control group) and motility (67 vs. 65.7 % in control) rates, neither did treatment with misoprostol+terbutalin (76 vs. 65% for live sperm and 77 vs. 66.3% for motility rates, in treated and control groups, respectively). These results suggest that the drugs do not influence sperm characteristics. The association of a β -agonist and PGE_1 induces an increase on cervical penetration during estrus in ewes without affecting *in vitro* sperm survival.

INTRODUÇÃO

Um dos problemas identificados com o insucesso da inseminação artificial em ovinos prende-se com a insuficiente abertura do *cervix*, impedindo que o pistolet de inseminação o transponha e que o sémen seja depositado no útero. Quando o sémen (refrigerado) é depositado à entrada do *os cervical*, só são conseguidas taxas de gestação aceitáveis à custa de uma maior concentração espermática na palhinha de inseminação (400-600 milhões) ou através de dupla inseminação.

Este trabalho teve por objectivo avaliar o efeito da aplicação vaginal de um análogo da prostaglandina E_1 (misoprostol), de um β -agonista (sulfato de terbutalina), da ocitocina e de um antagonista da progesterona (aglépristone) sobre o relaxamento muscular e dilatação do colo uterino de ovelhas em estro, visando o flanqueamento do *cervix* no momento da inseminação artificial para permitir a deposição do sémen no corpo uterino e/ou uma melhor progressão espermática.

MATERIAL E MÉTODOS

Estudos da penetrabilidade cervical

1. Animais e manejo: Este trabalho decorreu na Estação Zootécnica Nacional no Vale de Santarém. Foram utilizadas 77 ovelhas adultas multíparas, cíclicas, da raça Serra da Estrela, mantidas em boa condição corporal ao longo do ano. A dieta fornecida teve por base a silagem de milho, alternando com períodos de pastoreio na dependência da disponibilidade de erva.

2. Tratamentos: Só se utilizaram ovelhas cíclicas através da informação fornecida pelo doseamento de progesterona em 5 amostras de sangue intervaladas de 3 dias. As ovelhas foram inicialmente sujeitas a um tratamento de sincronização do estro e indução da ovulação, através da inserção de esponjas vaginais com 40 mg FGA (acetato de fluorogestona, Intervet®) durante 12 dias e injeção i.m. de 500 UI de PMSG no momento da sua remoção. Trinta e duas horas após a remoção das esponjas (REV) e durante um período de 26,5 horas, recolheram-se amostras de sangue de 4 em 4 horas, para doseamento da hormona luteinizante (LH) através do método E.L.I.S.A., utilizando o kit comercial Reprokit®. O pico pré-ovulatório (LH) em cada animal foi identificado como o valor mais elevado de unidade de densidade óptica (u.d.o.)

situado entre valores basais, permitindo determinar o intervalo REV-LH. Os coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaio, respectivamente de 4,6 e 8,76 %, foram determinados num total de 70 amostras doseadas em duplicado em seis sessões (Cavaco Gonçalves *et al.*, 1997). Na colheita de sangue realizada 42 horas após REV foi igualmente doseada progesterona para confirmação da luteólise. Esta hormona foi doseada por R.I.A. em fase sólida utilizando kits comerciais (Amerlab®, DPC) apresentando coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaio de 2,38% e 2,02%, respectivamente. A confirmação da resposta ao tratamento de indução da ovulação foi efectuada por laparoscopias realizadas cerca de 7 dias após a realização dos tratamentos.

Para estudar a dilatação do canal cervical utilizaram-se quatro fármacos, isoladamente, ou em associação: o antagonista da progesterona (P₄), aglépristone (Alizine®, Virbac), um preparado comercial de ocitocina (Oxitup®, Helsinn), o análogo sintético da prostaglandina E₁ (PGE₁), misoprostol (Cytotec®, Searle) e o agonista dos receptores β-adrenérgicos, sulfato de terbutalina (Bricanyl®, Astra), todos eles administrados por via transvaginal e depositados próximo do *os cervical*, instilados com seringa, ou por nebulização através de aplicador próprio no caso particular do Bricanyl. As doses administradas por animal e por tratamento foram de 0,15 g de aglépristone em 5 ml de excipiente oleoso, 20 UI de ocitocina contidas em 2 ml de excipiente e 2,5 mg de sulfato de terbutalina contidos em 10 nebulizações. O misoprostol foi administrado na dose de 400 µg, por dissolução de 2 comprimidos de Cytotec, em 2,5 ml de soro fisiológico. Os tratamentos foram realizados às 36 e 56 horas após REV aos animais pertencentes aos grupos tratados, após o que se procedeu à avaliação da penetrabilidade cervical quer nos animais tratados quer nos testemunha.

3. Grupos: Dos 77 animais inicialmente sujeitos ao tratamento de sincronização de estro e indução da ovulação, apenas 56 foram utilizados para as leituras de penetrabilidade cervical (Tabela 1). Os restantes 11 animais foram excluídos por motivos vários, tais como perda da esponja vaginal, ausência de ciclicidade, doença ou morte.

Tabela 1- Grupos e número de animais submetidos aos vários tratamentos

GRUPO	N	TRATAMENTO
ANTAGONISTA P ₄	8	Aglépristone
PGE ₁	4	Misoprostol
OCITOCINA	7	Ocitocina
β-ADRENÉRGICO	6	Terbutalina
PGE ₁ + β-ADRENÉRGICO	14	Misoprostol + Terbutalina
TESTEMUNHA	17	Sem tratamento
Total de Animais	56	

4. Penetrabilidade cervical: Após a abertura do canal vaginal, por meio de um espéculo munido de uma fonte de luz, foi introduzida uma vareta com 3,5 mm de diâmetro, com a qual se tentou cuidadosamente flanquear o *os cervical*. O grau de penetração da vareta no cérvix, foi medido em cm pela distância entre a extremidade introduzida no canal cervical e a marcação efectuada no momento da leitura, referenciada à abertura do espéculo vaginal ao nível da vulva. Trinta e seis horas depois da remoção das esponjas (momento 0) realizou-se a primeira avaliação, quer nos animais tratados quer nos testemunha, após o que se procedeu à administração do fármaco aos animais dos grupos tratados; 15, 30, 60, 90 e 120 minutos depois foram realizadas novas avaliações. Cinquenta e seis horas após a remoção das esponjas procedeu-se a nova avaliação da penetrabilidade cervical (momento 0) e nova administração da droga aos animais dos grupos tratados, sendo esta avaliação repetida aos 15, 30 e 60 minutos a todos os animais.

Utilização da associação misoprostol e sulfato de terbutalina sobre as características seminais:

Estudos *in vitro*: Testou-se o efeito do misoprostol, sulfato de terbutalina e sua associação no sémen ovino refrigerado, avaliando as características seminais.

MISOPROSTOL: Foi dissolvido 1 comprimido de Cytotec® (200 µg de Misoprostol) em 1,25 ml de soro fisiológico. A solução obtida foi posteriormente filtrada com um filtro de 0,45 µm (Sartorius-Ministar-600 kPa Max) obtendo-se um volume filtrado de 0,6 ml. Este volume foi adicionado a 250 µl de sémen de ovino diluído refrigerado (+15° C; sémen tratado C). Num volume de 250 µl de sémen ovino refrigerado adicionou-se 0,6 ml de soro fisiológico (sémen testemunha T). Procedeu-se então à avaliação aos 0, 30 e 60 minutos, quer no sémen C quer no sémen T, dos seguintes parâmetros: mobilidade massal, % de espermatozóides móveis e % de espermatozóides vivos (coloração vital-eosina nigrosina).

SULFATO DE TERBUTALINA: A 250 µl de sémen refrigerado diluído adicionaram-se 2,5 mg de sulfato de terbutalina, contidos em 10 nebulizações de Bricanyl® (sémen B). Como sémen testemunha (sémen T) foram utilizados 250 µl de sémen refrigerado diluído. A metodologia e parâmetros avaliados foram os acima referidos.

MISOPROSTOL + SULFATO DE TERBUTALINA: Para a preparação do sémen tratado com a associação de misoprostol e sulfato de terbutalina (sémen CB) utilizaram-se 250 µl de sémen refrigerado diluído aos quais se adicionaram 0,7 ml do filtrado de Cytotec preparado da forma já descrita e 2,5 mg de sulfato de terbutalina. Como testemunha (sémen T) foram utilizados 250 µl de sémen refrigerado diluído aos quais se adicionaram 0,7 ml de soro fisiológico.

Análise estatística: Os resultados obtidos foram analisados por ANOVA/MANOVA e teste das menores diferenças significativas (LSD) no ensaio das penetrabilidades, e pelo teste de χ^2 no ensaio *in vitro*, utilizando o programa informático Statistica (Statsoft, Inc. 1995). O nível de significância utilizado foi de $P \leq 0,05$.

RESULTADOS

A administração da associação misoprostol / terbutalina às 36 horas após REV conduziu a um aumento significativo da penetrabilidade cervical aos 15 minutos. Nos restantes tratamentos não foi encontrado nenhum efeito sobre este parâmetro (tabela 2; gráfico 1).

Tabela 2. Efeito dos tratamentos aplicados a partir das 36 h após REV, sobre a penetrabilidade cervical (média ± ep, em cm).

Grupo	n	Minutos pós tratamento					
		0	15	30	60	90	120
Testemunha	17	22,5 ± 0,68	22,5 ^a ± 0,74	22,9 [*] ± 0,82	22,9 ^a ± 0,81	22,8 ^a ± 0,86	23,0 [*] ± 0,94
Aglépristone	8	22,9 ± 0,81	23,5 ^b ± 0,87	23,2 ± 0,54	23,2 ± 0,79	23,4 ^b ± 0,85	23,4 ± 0,76
Terbutalina	6	22,3 ± 0,63	22,6 ± 0,89	22,8 ± 0,94	22,9 ± 0,73	23 ± 1,07	23,1 ± 1,22
Misoprostol	4	22,4 ± 0,66	22,9 ± 0,78	23 ± 0,95	22,9 ± 0,66	22,8 ± 0,73	23,1 ± 1,06
Ocitocina	7	22,8 ± 0,82	22,7 ± 0,53	22,6 ± 0,37	22,8 ± 0,81	22,8 ± 0,71	22,9 ± 0,91
Miso +Terb	14	22,5 ¹ ± 0,82	23,0 ^{b2} ± 0,89	23,4 ^{*2} ± 0,98	23,5 ^{b2} ± 1,27	23,6 ^{b2} ± 1,48	23,6 ^{*2} ± 1,20

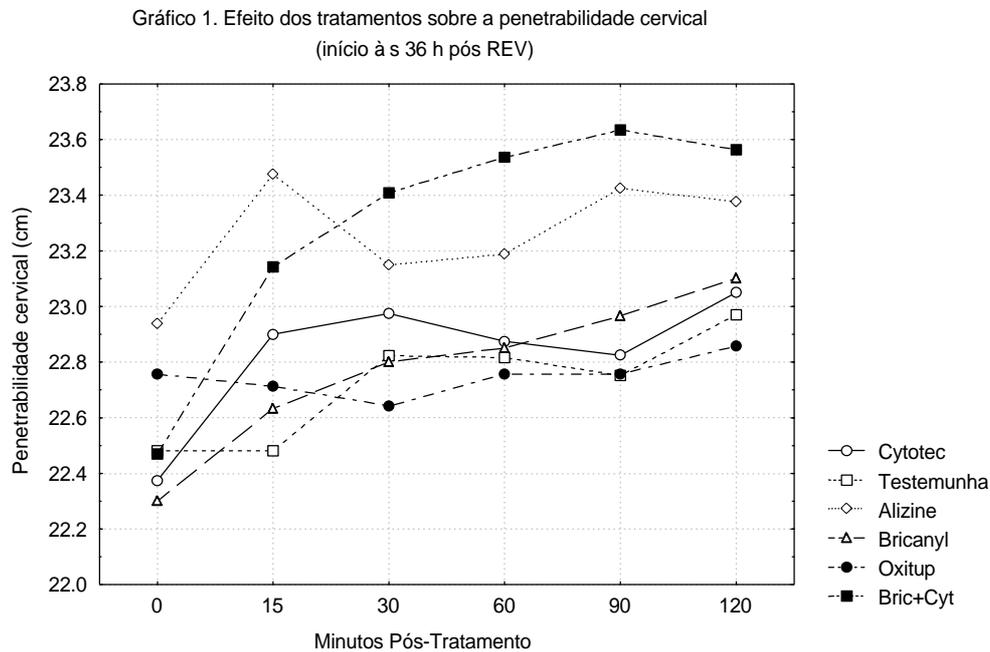
Nas colunas, letras diferentes correspondem a diferenças significativas ($P < 0,05$)

^{*} Médias na mesma coluna, médias diferentes para $P = 0,07$.

Nas linhas, números diferentes correspondem a diferenças significativas ($P < 0,05$)

A penetrabilidade inicial não foi diferente entre os vários grupos. Aos 15 minutos verificou-se um aumento significativo para o grupo aglépristone e para a associação misoprostol

/ terbutalina, em relação ao grupo testemunha. Esta diferença manteve-se no caso da associação misoprostol / terbutalina, aos 60 e aos 90 minutos. O grupo aglépristone foi também significativamente superior à testemunha aos 90 minutos (tabela 2; gráfico 1).



Quanto aos tratamentos efectuados 56 horas após REV apenas foi observado um aumento significativo da penetrabilidade cervical no grupo tratado com a associação misoprostol / terbutalina logo aos 15 minutos (tabela 3; gráfico 2).

Tabela 3. Efeito dos tratamentos aplicados a partir das 56 h após REV, sobre a penetrabilidade cervical (média \pm ep, em cm).

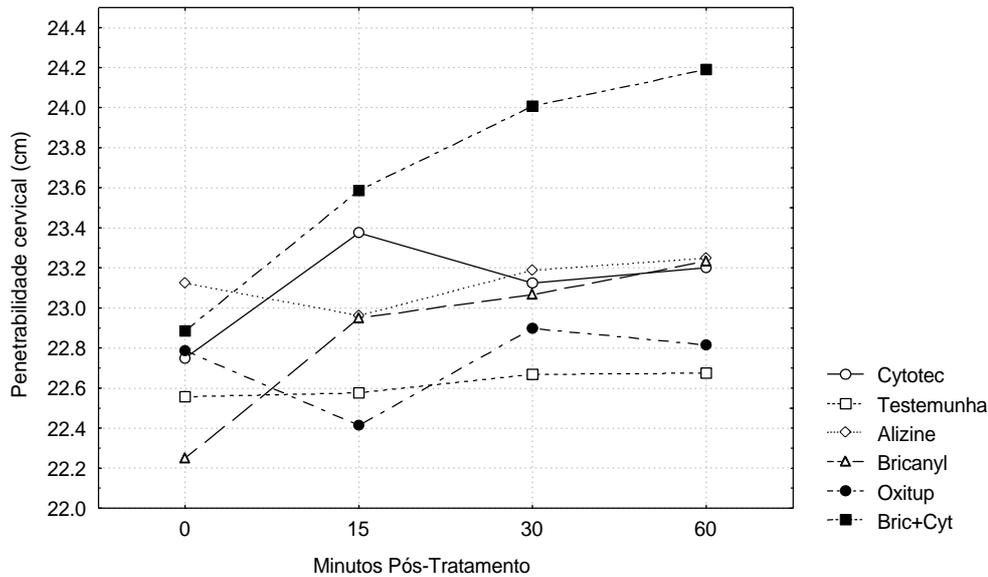
Grupo	n	Minutos pós tratamento			
		0	15	30	60
Testemunha	17	22,6 \pm 0,92	22,6 ^a \pm 0,86	22,7 ^a \pm 0,67	22,7 ^a \pm 0,99
Aglépristone	8	23,1 \pm 0,68	23,0 \pm 0,72	23,2 \pm 0,88	23,3 \pm 0,77
Terbutalina	6	22,3 \pm 0,82	23,0 \pm 0,75	23,1 \pm 1,01	23,2 \pm 0,75
Misoprostol	4	22,8 \pm 0,42	23,4 \pm 0,74	23,1 \pm 0,26	23,2 \pm 0,75
Ocitocina	7	22,8 \pm 0,38	22,4 \pm 0,70	22,9 \pm 0,66	22,8 \pm 0,80
Miso +Terb	14	22,9 ¹ \pm 0,97	23,6 ^{b2} \pm 1,30	24,0 ^{b2} \pm 1,30	24,2 ^{b2} \pm 1,51

Nas colunas, letras diferentes correspondem a diferenças significativas ($P < 0,003$)

Nas linhas, números diferentes correspondem a diferenças significativas ($P < 0,05$)

Na comparação dos vários grupos com o grupo testemunha, em cada momento de observação após a administração dos tratamentos (15, 30 e 60 minutos), apenas foi observado um aumento significativo da penetrabilidade do grupo misoprostol / terbutalina (Tabela 3; gráfico 2).

Gráfico 2. Efeito dos tratamentos sobre a penetrabilidade cervical
(início à s 56 h pós REV)



Nos animais pertencentes aos vários grupos em estudo (n=56) não foram observadas diferenças significativas relativamente ao intervalo remoção das esponjas vaginais - pico de LH (REV-LH), cujo intervalo médio foi de $46,13 \pm 7,57$ horas.

Estudos *in vitro*: O sêmen tratado com misoprostol apresentou um valor médio (leitura aos 0, 30 e 60 minutos) de 59 % de spz vivos e 66,3 % de spz móveis, valores estes que não foram diferentes dos observados no sêmen testemunha (69,2 % e 66,6 %, respectivamente). O tratamento do sêmen terbutalina não conduziu igualmente a diferenças significativas, quer para a % de spzs vivos (78 % vs. 74,2 %), quer móveis (67 % vs 65,7 %). A associação dos dois fármacos (misoprostol mais terbutalina) não influenciou significativamente qualquer dos parâmetros em estudo, tendo a % média de spzs vivos e a % média dos spzs móveis sido de 76 % e 65 % no grupo tratado e de 77 % e 66,3 % no sêmen testemunha.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A administração de 20 UI e 5 UI de ocitocina i.v., algumas horas antes da inseminação artificial, permite que o cérvix seja flanqueado pelo pistolet de inseminação e que o sêmen seja depositado no útero, havendo em contrapartida uma redução drástica na fertilidade devido a contracções tetânicas do útero (Sayre e Lewis, 1996; Sayre e Lewis, 1997), cuja duração é função da dose administrada. Mesmo com a dose de 5 UI por via i.v., já se verifica tetania e flanqueamento do cérvix somente em 60% dos animais. A administração de 20 UI de ocitocina por via transvaginal (Barbas et al., 1999) ou 1 UI i.v. (Jones et al., 1969), não afecta a fertilidade. No nosso trabalho, a administração transvaginal de ocitocina (20 UI) não conduziu a um aumento da penetrabilidade cervical ao longo do período de observação, nem às 36 h nem às 56 h pós REV. É provável que a diferença de resultados observados possa ser justificada pela via de administração utilizada que não permitiu uma acção farmacológica da ocitocina, contrariamente à que é detectada quando se utiliza a via intravenosa. Estes trabalhos, no seu conjunto, sugerem que a dose e a via de administração de ocitocina podem afectar de forma diferente (e contraditória) quer a dilatação cervical, quer a fertilidade.

Na ovelha o cérvix tem a capacidade endógena de produzir prostaglandinas cuja concentração aumenta significativamente no momento do parto, coincidindo com o amolecimento cervical (Ellwood *et al.*, 1980, cit. Owiny e Fitzpatrick, 1992), e sendo indispensáveis a este processo, o qual não se verifica após inibição da sua síntese (Ledger *et al.*, 1985; Owiny e Fitzpatrick, 1992). De acordo com O'Brien (1995) parecem existir diferenças entre os vários tipos de prostaglandinas, sendo as prostaglandinas da série E mais útero-selectivas e

superiores às prostaglandinas da série F, no amolecimento cervical. A deposição de PGE₂ na vagina ou cérvix da mulher, ovelha, égua ou vaca origina um amolecimento e dilatação cervical *in vivo*, independentemente do estadio fisiológico e das concentrações de progesterona (Owiny e Fitzpatrick, 1990; Stys *et al.*, 1981, cit. Lavoir e Betteridge, 1996), verificando-se igualmente um aumento da contractilidade uterina no caso dos bovinos (Lavoir e Betteridge, 1996). Na mulher, a aplicação antes do parto de prostaglandinas no cérvix - PGE₁, PGE₂, PGF₂, PGI₂ e 6-ceto-PGF_{1 α} - induz a dilatação cervical (Bryman *et al.*, 1986; Nunes *et al.*, 1999). Todas elas actuam através da diminuição da actividade contráctil da musculatura cervical, sendo a PGE₂ aquela que apresenta uma actividade inibidora mais potente e em doses mais baixas (Bryman *et al.*, 1986). No caso particular da ovelha, a PGE₂ administrada localmente no final da gestação, provoca um aumento da extensibilidade cervical 4 vezes superior às testemunhas, mas sem induzir alterações nas contracções uterinas (Ledger *et al.*, 1983; Owiny e Fitzpatrick, 1990). Nesta espécie, não existem estudos sobre o efeito da PGE₂ na actividade muscular do cérvix, mas sabe-se que também nela as prostaglandinas facilitam a dilatação cervical, ao induzirem a libertação de colagenases, as quais promovem o amolecimento do colagénio (Ellwood, 1980; Osmer *et al.*, 1991; Sayre e Lewis, 1997). O misoprostol, um análogo sintético da PGE₁, tem mostrado ser altamente eficiente na indução da abertura cervical e no estímulo da actividade contráctil do miométrio (Nunes *et al.*, 1999; Katz *et al.*, 2000). No nosso trabalho a administração local de 400 μ g de misoprostol, se conduziu a eventuais alterações na estrutura cervical, estas não foram suficientes para originar um aumento da penetrabilidade cervical ao longo do tempo nos animais tratados.

A administração de agonistas β ₂-adrenérgicos induz relaxamento ao nível do miométrio (Bramuglia *et al.*, 1993, cit. Ramos e Silveira, 2000), tendo a administração de clenbuterol reduzido para 1/3 a força necessária para promover o estiramento das tiras cervicais *in vitro* (Owiny e Fitzpatrick, 1992). Enquanto que alguns agonistas dos receptores β -adrenérgicos inibem as contracções do músculo cervical (terbutalina), outros como a isoprenalina, estimulam essa actividade (Bryman *et al.*, 1984, 1986). No nosso trabalho, a administração do β -adrenérgico terbutalina não conduziu a um aumento significativo da penetrabilidade em qualquer dos momentos de administração.

De acordo com Chwalisz (1994) os antagonistas dos receptores da progesterona têm capacidade de inibir as contracções da musculatura cervical. A sua acção a este nível parece ser independente das prostaglandinas, mas depender da acção local das citoquinas e outros agentes quimiotácticos sintetizados pela mobilização dos granulócitos polimorfonucleados, macrófagos e mastócitos, mobilizados para o cérvix em consequência da administração de antiprogestagénios (onapristone e mifepristone) e inibidores da síntese da progesterona como o epostane (Chwalisz, 1994). A redução do número de receptores α ₂-adrenérgicos ao nível do cérvix após a administração destas drogas poderá também explicar a sua acção inibidora das contracções cervicais (Kovacs e Falkay, 1993). Por outro lado, a administração de antagonistas da progesterona induz também dilatação cervical, nomeadamente na mulher grávida (Elliot *et al.*, 1998; Stenlund, *et al.*, 1999) a qual parece resultar do aumento de adesividade dos granulócitos ao endotélio capilar (Kemp *et al.*, 1998) ou, de acordo com Ogawa *et al.*, (1998), da estimulação pelas citoquinas inflamatórias do muco cervical da produção de ácido hialurónico nos fibroblastos cervicais. A administração do antagonista da progesterona onapristone provocou uma retenção espermática cervical, impedindo a progressão dos espermatozóides para o oviducto e a fertilização (Cavaco Gonçalves *et al.*, 1997; Cavaco Gonçalves e Horta, 1997), o que parece resultar de alterações quantitativas e qualitativas da actividade mioeléctrica uterina induzidas pela droga (Gonçalves *et al.*, 2001). No nosso trabalho, a administração de aglépristone às 36 horas após REV, originou um aumento significativo da penetrabilidade cervical aos 15 e aos 90 minutos comparativamente ao grupo testemunha, não existindo referências da sua utilização na espécie ovina com este objectivo.

De todos o tratamentos utilizados, a associação de misoprostol com terbutalina foi o que provocou maior penetrabilidade cervical, que se manteve ao longo do tempo, e não afectou as características seminais *in vitro*. Verificou-se uma acção sinérgica das duas substâncias utilizadas, uma vez que quando aplicadas isoladamente não causaram qualquer efeito. Estes resultados sugerem existir um efeito benéfico do tratamento sobre o relaxamento cervical,

sendo ainda necessário confirmar este efeito em ensaios de campo sobre os resultados da inseminação artificial.

BIBLIOGRAFIA

- Barbas, J; Mascarenhas, R.; Baptista, C. e Horta, A.E.M. (1999). Efeito da Administração de Oxitocina em Ovelhas Serra da Estrela Inseminadas Artificialmente sobre a Fertilidade, Prolificidade e Fecundidade. IX Congresso de Zootecnia, "A Zootecnia no 3º Milénio", Porto, 11-13 Nov 1999, Resumos (P74), pag. 138.
- Bryman I, Norstrom A, Lindblom B. (1986). Influence of prostaglandins and adrenoceptor agonists on contractile activity in the human cervix at term. *Obstet Gynecol*, 67: 574-578
- Bryman, I., Lindblom, B., Norstrom, A., Sahni, S. (1984). Adrenoceptor mechanisms in the regulation of contractile activity in the human cervix. *Obstet Gynecol*, 64: 363-367.
- Cavaco Gonçalves, S., Horta A.E.M. (1997). Efeito do bloqueio dos receptores da progesterona sobre o mecanismo da ovulação em ovelhas superovuladas. *Proceedings do 1º Congresso Ibérico de Reprodução Animal*, 3-6 Julho 1997, Estoril, Vol. II, pp. 293-298
- Cavaco Gonçalves, S., Marques, C.C., Stöckemann, K., Wang, W., Horta, A.E.M. (1997). Influence of an antiprogestin (onapristone) on in vivo and in vitro fertilization. *Anim. Reprod. Sci.*, 46: 55-67(1997)
- Chwalisz, K. (1994). The use of progesterone antagonists for cervical ripening and as an adjunct to labour and delivery. *Hum. Reprod.*, 9 Suppl 1: 131-161
- Elliot, C.; Brennand, J. e Calder, A. (1998). The effects of mifepristone on cervical ripening and labour induction in primigravidae. *Obstet. Gynecol.*, 92 (5): 804-809.
- Ellwood, D.A., (1980). The hormonal control of connective-tissue changes in the ovine cervix in pregnancy and at parturition. *Biochem. Soc. Trans.*, 8: 662-667.
- Gonçalves, S.C., Horta, A.E.M., Marques, C.C., Vasques, M.I. (2001). Efeito da PMSG e de um antagonista da progesterona sobre a actividade mioeléctrica uterina em ovinos. *Proceedings do 3º Congresso Ibérico de Reprodução Animal*, Porto, 6-8 Julho.
- Jones, R., Martin, I., Lapwood, K., 1969. Studies of the artificial insemination in sheep: The effects on fertility of diluting ram semen. Stage of oestrus of the ewe at insemination and injection of synthetic oxytocin. *Aust. J. Agric. Res.*, 20: 141-150.
- Katz, V.; Farmer, R; Dean, C. e Carpenter, M. (2000). Use of misoprostol for cervical ripening. *South Med. J.* 93 (9): 881-884.
- Kemp, B.; Winkler, M.; Hauptmann, S. e Rath, W. (1998). Cervical dilation: induction by antigestagens via adhesion molecules. An in vitro examination in endothelial cell cultures. *Gynecol. Obstet. Invest.*, 45(2): 116-120.
- Kovacs, L., Falkay, G. (1993). Changes in adrenergic receptors in the pregnant human uterine cervix following mifepristone or placebo treatment in the first trimester. *Hum. Reprod.*, 8(1): 119-121.
- Lavoir, C. e Betteridge, K. (1996). The use of prostaglandins and oxytocin for transcervical recovery of bovine fetuses at days 33-58 of gestation. *Journal of Reproduction and Fertility*, 106: 95-100.
- Ledger, W.L., Ellwood, D.A., Taylor, M.J. (1983). Cervical softening in late pregnant sheep by infusion of prostaglandin-E2 into cervical artery. *J. Reprod. Fertil.*, 69: 511-515.
- Ledger, W.L.; Webster, M.; Anderson, A. e Turnbull, A. (1985). Effect of inhibition of prostaglandin synthesis on cervical softening and uterine activity during ovine parturition resulting from progesterone withdrawal induced by epostane. *J. Endocrinol.*, 105 (2): 227-233.
- Nunes F., Rodrigues R., Meirinho M. (1999). Randomized comparison between intravaginal misoprostol and dinoprostone for cervical ripening and induction of labor. *Am J Obstet Gynecol*, 181(3): 626-629.
- O'Brien, W. (1995). The role of prostaglandins in labor and delivery. *Clin. Perinatol.*, 22 (4): 973-984.
- Ogawa, M.; Hirano, H.; Tsubaki, H.; Kodama, H. e Tanaka, T. (1998). The roles of cytokines in cervical ripening: correlations between the concentrations of cytokines and hyaluronic acid in cervical mucus and the induction of hyaluronic acid production by inflammatory cytokines by human cervical fibroblasts. *Am. J. Obstet Gynecol.*, 179 (1): 105-110.
- Osmers, R., Rath, W., Adelman-Grill, B.C., Fittkow, C., Szeverenyi, M., Kunh, W. (1991). Collagenase activity in the human cervix uteri after prostaglandin E2 application during the first trimester. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 42: 29-32.
- Owiny, J.R., Fitzpatrick, R.J. (1990). Effect of intravaginal application of prostaglandin E2 gel on the mechanical properties of the ovine cervix uteri at term. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 163: 657-660.
- Owiny, J.R., Fitzpatrick, R.J. (1992). The effect of administration of Clenbuterol (4-amino α -[(tert-butyl-amino) methyl]-3,5-dichlorobenzoyl alcohol), a β_2 -mimetic, and of sodium meclofenamate, a prostaglandin synthetase inhibitor, on cervical ripening in periparturient sheep. *Animal Reproduction Science*, 27 : 41-48.
- Ramos, F. e Noronha da Silveira, M. (2000). Agonistas adrenérgicos β_2 e produção animal: I mecanismo de acção. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, Vol XCV, nº 535: 99-110.
- Sayre, B.L., Lewis, G.S. (1996). Cervical dilatation with exogenous oxytocin does not affect sperm movement into the oviducts in ewes. *Theriogenology*, 45: 1523-1533.
- Sayre, B.L., Lewis, G.S. (1997). Fertility and ovum fertilization rate after laparoscopic or transcervical intrauterine artificial insemination of oxytocin-treated ewes. *Theriogenology*, 48: 267-275.
- Stenlund, P.; Ekman, G.; Aedo, A. e Bygdeman, M. (1999). Induction of labor with mifepristone - a randomized, double-blind study versus placebo. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 78 (9): 793-798.