

## Efeito do flunixin meglumine na taxa de prenhez de vacas leiteiras inseminadas em tempo-fixo

Luiz Francisco Machado Pfeifer<sup>1\*</sup>, Natália Ávila de Castro<sup>2</sup>, Péricles de Nascimento Duarte<sup>3</sup>, Lucas Meneghello<sup>3</sup>, Augusto Schneider<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Pesquisador A da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA – Rondônia). Porto Velho, RO, Brasil.

<sup>2</sup>Doutoranda na Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Pelotas, RS, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas, Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão. Pelotas, RS, Brasil.

<sup>4</sup>Docente Pesquisador na Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Nutrição. Pelotas, RS, Brasil.

\*Autor para correspondência, E-mail: [luiz.pfeifer@embrapa.br](mailto:luiz.pfeifer@embrapa.br)

**RESUMO.** O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do flunixin meglumine (FM) após a inseminação artificial em tempo-fixo (IATF) sobre a taxa de prenhez de vacas de leite. Foram utilizadas 87 vacas lactantes da raça holandês, com produção média de  $30,3 \pm 10,2$  kg de leite/d, com  $181 \pm 152$  dias em lactação (DEL). As vacas receberam um implante auricular contendo 3mg de norgestomet e uma injeção de 2 mg de benzoato de estradiol, i.m., no Dia 0. No Dia 7 as vacas receberam 0,53 mg de cloprostenol sódico i.m. e, no Dia 9, o implante foi removido. Quarenta e oito horas após a remoção do implante, foi administrado 100 mg de gonadorelina e as vacas foram inseminadas artificialmente em tempo-fixo (IATF) 12 h mais tarde. Quinze dias após a IATF, as vacas foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos; 1) Grupo FM (n = 46), que recebeu duas injeções de flunixin meglumine (1,1 mg / kg de peso corporal) com intervalo de 12 h, e 2) Grupo Controle (CTL, n = 41), que não recebeu nenhum tratamento. O diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia aos 30 e 60 após a IATF. A taxa de prenhez foi comparada entre os grupos pelo teste do qui-quadrado. A taxa de prenhez nas vacas tratadas com flunixin meglumine foi maior aos 30 (37% vs 17%; P <0,05) e aos 60 dias após a IATF (37 % vs 15 %; P <0,05). Em conclusão, a aplicação de duas doses de flunixin meglumine aumentou a taxa de prenhez de vacas de leite.

**Palavras chave:** bovinos, fertilidade, reconhecimento da gestação.

## Effect of flunixin meglumine on pregnancy rate of fixed-time inseminated dairy cows

**ABSTRACT.** The aim of this study was to determine the effect of flunixin meglumine (FM) following timed artificial insemination (TAI) on pregnancy rate in lactating Holstein cows. Eighty-seven lactating Holstein dairy cows ( $30.3 \pm 10.2$  kg milk/day) with average  $181 \pm 152$  days in milk (DIM) were given a 3 mg norgestomet ear-implant and a 2 mg injection of estradiol benzoate i.m. on Day 0. On Day 7, 0.53 mg i.m. of sodium cloprostenol was injected, and the implant removed on day 9. Two days later, 100 µg i.m. of gonadorelin was given followed by TAI 12 h later. Cows were randomly assigned into one of the following treatments: 1) FM Group (n=46) injected twice with FM given 12 h apart on the evening of Day 15 and the morning of Day 16, and; 2) Control Group (n = 41), that did not receive any further treatment. Pregnancy was detected by ultrasonography at Days 30 and 60 after TAI. Effect of treatment on pregnancy rate (PR) was analyzed by chi-square test. Cows treated with FM had higher pregnancy rate at 30 days (37% vs. 17%) and 60 days (37% vs. 15%) after TAI (P<0.05). In conclusion, injection of two doses of flunixin meglumine 15 days after TAI increased pregnancy rate of lactating dairy cows.

**Keywords:** cattle, fertility, pregnancy recognition.

## Introdução

Em bovinos, a concepção e o estabelecimento da gestação logo após o período voluntário de espera podem ser afetados por diversos fatores, tais como estresse térmico (Putney et al., 1989; Malayer et al., 1990), nutrição inadequada (Butler et al., 1998) e perdas embrionárias e fetais causadas por falhas na manutenção do corpo lúteo (Santos et al., 2004). Este último pode ser ocasionado devido ao aumento na liberação de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) endometrial, o que leva a luteólise prematura, e assim reduz a secreção de progesterona, responsável pela manutenção da gestação (Garverick et al., 1992; Al-Gubory & Abdennebi, 1996). Além disso, perdas embrionárias podem ocorrer devido à deficiente produção da proteína trofoblástica interferon- $\tau$  (IFN- $\tau$ ), que é responsável por inibir a secreção de  $PGF_{2\alpha}$  pelo endométrio (Demmers et al., 2001). Uma insuficiente produção de IFN- $\tau$  pode ocasionar a regressão precoce do corpo lúteo e a consequente perda gestacional devido ao não reconhecimento materno da gestação.

No intuito de evitar perdas gestacionais, novas alternativas para impedir a luteólise pós-concepção têm sido estudadas. Elli et al. (2001) demonstraram que a administração de Lisinato de Ibuprofeno, um antiinflamatório com aparente efeito antiluteolítico, previamente ao procedimento de transferência de embriões aumentou as taxas de prenhez. Um fármaco amplamente utilizado na clínica veterinária e com potencial efeito antiluteolítico é o flunixin meglumine (FM), um antiinflamatório não esteróide derivado do ácido nicotínico. O mecanismo de ação do FM consiste em inibir a atividade da enzima prostaglandina H synthase-2 (PGHS-2) impedindo assim, a conversão do ácido aracônico em  $PGF_{2\alpha}$  (Anderson et al., 1990). De acordo com Guilbault et al. (1987), a administração intramuscular de flunixin meglumine durante os seis primeiros dias pós-parto, inibe a secreção de  $PGF_{2\alpha}$  por um período mínimo de 24 horas. Quando administrado em vacas gestantes antes de uma situação de estresse, o fármaco atua de forma semelhante, tendo ação preventiva na perda gestacional (Merrill et al., 2003). Guzeloglu et al. (2006) relataram que a administração de duas doses intramusculares de flunixin meglumine, nos dias 15 e 16 após a IATF em novilhas leiteiras, resultou em um aumento na taxa de prenhez.

Baseado nessas considerações, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da injeção de duas doses de flunixin meglumine, entre os dias 15 e 16 após a IATF na taxa de prenhez em vacas da raça holandês em lactação. O estudo baseou-se na hipótese de que a aplicação de flunixin meglumine na fase crítica de secreção de prostaglandina aumenta a taxa de prenhez de vacas inseminadas em tempo-fixo.

## Material e Métodos

O estudo foi realizado no período de junho a setembro, em uma propriedade rural localizada no município de Vacaria, RS, Brasil (28°30'39''S, 50°55'47''O). Oitenta e sete vacas lactantes da raça Holandesa com escore de condição corporal entre 2,5 e 3,5, produção leiteira média de  $30,3 \pm 10,2$  kg/dia, e média de  $181 \pm 152$  dias em lactação (DEL), foram sincronizadas para serem inseminadas em tempo-fixo.

O protocolo de sincronização (Figura 1) consistiu na inserção de um implante auricular contendo 3,0 mg de norgestomet (Crestar<sup>®</sup>, Intervet) associado a 2,0 mg, i.m., de benzoato de estradiol (BE, Gonadiol<sup>®</sup>, MSD Saúde Animal) administrados em dias aleatórios do ciclo estral em todas as vacas no Dia 0. Sete dias após as vacas receberam 500  $\mu$ g i.m. de cloprostenol sódico, ( $PGF_{2\alpha}$ ; Ciosin<sup>®</sup>, Schering-Plough), e no Dia 9 o implante auricular foi removido. No Dia 11 foi administrado 100  $\mu$ g i.m. de gonadorelina (Fertagyl<sup>®</sup>, Intervet) e após 12 horas todas as vacas foram submetidas a IATF. Quinze dias após a IATF, os animais foram aleatoriamente separados em dois grupos: 1) Grupo Flunixin Meglumine (FM, n = 46), que recebeu duas doses de flunixin meglumine (1,1 mg/kg de peso corporal; im, Banamine<sup>®</sup>, Schering-Plough), com intervalo de 12 horas entre os tratamentos, sendo realizado às 20:00 h do Dia 15 e às 08:00 do Dia 16 após a IATF; e 2) Grupo Controle (n = 41), que não recebeu tratamento após a IATF.

O diagnóstico de prenhez foi realizado por ultrassonografia transretal (Aloka SSD – 500 com 7,5 MHz, transdutor linear; Aloka, Tóquio, Japão) nos dias 30 e 60 após a IATF. Os efeitos do tratamento sobre a taxa de prenhez foram analisados pelo teste do qui-quadrado. As perdas gestacionais foram determinadas pela diferença nas taxas de prenhez/IA observadas nos diagnósticos feitos nos dias 30 e 60 após a IATF. O teste foi considerado estatisticamente significativo quando o valor de  $P < 0,1$ .

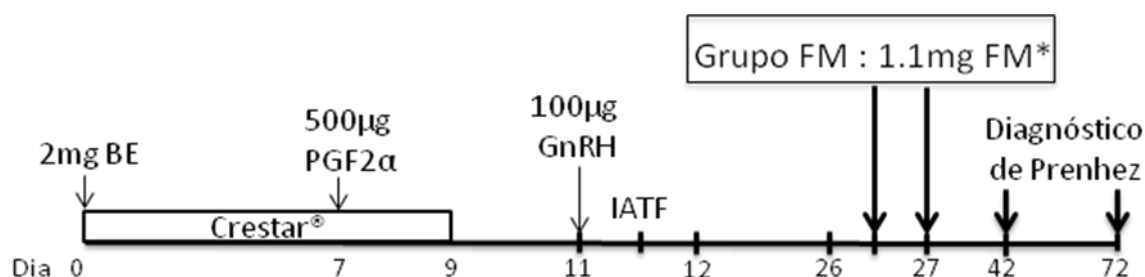


Figura 1. Representação gráfica do desenho experimental usado para avaliar o efeito de flunixin meglumine sobre a Prenhez/IA de vacas leiteiras. \*Injeção de flunixin meglumine somente no Grupo FM. BE = benzoato de estradiol, PGF<sub>2α</sub> = análogo de Prostaglandina F2 alfa, Cloprostenol sódico, GnRH = análogo de Hormônio liberador de Gonadotrofinas, Gonaderalina, IATF = Inseminação artificial em tempo fixo.

## Resultados e Discussão

As vacas tratadas com duas doses de flunixin meglumine (Grupo FM) apresentaram maior taxa de prenhez (37%) do que as vacas do Grupo controle (17%;  $P = 0,07$ ) aos 30 dias pós IATF. Nenhuma das vacas do grupo FM teve perda gestacional entre os dias 30 e 60 após a IATF, enquanto que em apenas uma das vacas do grupo controle foi diagnosticado perda gestacional. De acordo com os dados obtidos neste estudo, pode-se inferir que a administração de duas doses de FM após a IATF, aparentemente pode inibir a secreção de prostaglandina e melhorar o reconhecimento materno da gestação, ocasionando efeito positivo sobre a taxa de gestação em vacas da raça Holandês lactantes. O efeito benéfico de injeções de FM sobre a taxa de prenhez já foi descrito anteriormente (Guzeloglu et al., 2006); entretanto, o presente trabalho demonstrou esse efeito em vacas lactantes de alta produção. Além disso, este estudo utilizou um protocolo de IATF à base de progesterona e estradiol, amplamente aplicado no Brasil. Nossos resultados demonstraram que, no grupo que recebeu flunixin meglumine, a taxa de prenhez foi considerada adequada para bovinos de leite, no entanto, o grupo controle apresentou baixas taxas, visto que são considerados razoáveis índices entre 35 e 45% de gestação em 27-31 dias após a IATF em vacas leiteiras (Santos et al., 2004).

No presente trabalho, assim como no de Guzeloglu et al. (2006) a administração do flunixin meglumine foi feita nos dias 15 e 16, pois esse momento é considerado a fase crítica antiluteolítica da gestação. Em condições fisiológicas, aos 15-17 dias após o acasalamento, ocorre o pico nas concentrações da proteína trofoblástica interferon  $\tau$  (Bartol et al., 1985;

Geisert et al., 1988), a qual inibe a produção de PGF<sub>2α</sub> endometrial, sendo essencial para que se estabeleça a gestação em bovinos (Bazer et al., 1991; Roberts et al., 1992). O IFN- $\tau$  é produzido pelo concepto a partir do 12º dia da gestação devido a expressão de genes trofoblásticos de interferon (Farin et al., 1990), e seu efeito antiluteolítico resulta da inibição da expressão de receptores da ocitocina endometrial, inibindo assim a liberação da PGF<sub>2α</sub> (Demmers et al., 2001). Portanto, considera-se que o desenvolvimento comprometido do embrião e o subdesenvolvimento do trofocotoderma sejam responsáveis pela luteólise prematura. Assim, Odensvik et al. (1998) relataram que a administração de flunixin meglumine em novilhas durante nove dias, a partir do 15º dia do ciclo estral, reduziu o número de pulsos de PGFM, retardou a luteólise e prolongou significativamente a duração do ciclo, o que teoricamente pode aumentar as chances de o embrião produzir IFN- $\tau$  suficiente para manter a gestação e impedir por si só a secreção de PGF<sub>2α</sub>.

De acordo com Schrick et al. (1993), a qualidade do embrião em vacas de corte tende a ser negativamente correlacionada com elevadas concentrações de PGF<sub>2α</sub> secretada pelo endométrio. Em um estudo in vitro, Scenna et al., (2004) relataram que a PGF<sub>2α</sub> teve um efeito negativo direto sobre o desenvolvimento embrionário; entretanto ao inibir a secreção de PGF<sub>2α</sub> pelo tratamento com flunixin meglumine, a taxa de perda gestacional sofre redução (Guzeloglu et al., 2006). Elli et al. (2001) demonstraram que a administração de um anti-inflamatório não esteróide (lisinato de ibuprofeno) em vacas submetidas a transferência de embriões no momento da transferência resultou em um aumento de 26% nas taxas de

gestação em relação àquelas que não receberam o tratamento. Estudos prévios utilizando flunixin meglumine em vacas e novilhas de corte não demonstraram resultados satisfatórios, possivelmente devido ao baixo desafio reprodutivo sofrido por estas categorias (Pfeifer et al., 2008). No entanto, segundo Merrill et al. (2007), vacas de corte que receberam flunixin meglumine previamente a um estresse induzido apresentaram redução nas concentrações séricas de PGFM (principal metabólito da PGF<sub>2α</sub>), além de haver uma tendência de aumento nas taxas de gestação.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que inibir a secreção de PGF<sub>2α</sub> por meio da administração de flunixin meglumine entre 15 e 16 dias após a IATF favorece o estabelecimento e manutenção da gestação em bovinos, aumentando a taxa de prenhez em vacas holandês lactantes. Desta forma, a hipótese de que a administração de FM na fase crítica anti-luteolítica de desenvolvimento embrionário incrementam a taxa de prenhez foi suportada. No entanto, para que se encontre um método que efetivamente melhore a comunicação materno-fetal e o desenvolvimento embrionário precoce, mais estudos direcionados especificamente a estes eventos devem ser realizados.

### Referências Bibliográficas

- Al-Gubory, H.K. & Abdnebi, L. (1996). Evidence that the conceptus contributes to the inhibition of follicular grow in the ewe. *Animal Reproduction Science*, 45:71–80.
- Anderson, K. L., Neff-Davis, C. A., Davis, L. E., Bass, V. D. (1990). Pharmacokinetics of flunixin meglumine in lactating cattle after single and multiple intramuscular and intravenous administrations. *American Journal of Veterinary Research*, 51:1464–1467.
- Bartol, F.F., Roberts, R.M., Bazer, F.W., Lewis, G.S., Godkin, J.D., Thatcher, W.W. (1985). Characterization of proteins produced in vitro by periattachment bovine conceptuses. *Biology of Reproduction*, 32:681–93.
- Bazer, F. W., Thatcher, W.W., Hansen, P.J., Mirando, M.A., Ott, T.L., Plante, C. (1991). Physiological mechanisms of pregnancy recognition in ruminants. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 43:39–47.
- Butler, W.R. (1998). Review: effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 81:2533–2539.
- Demmers, K.J., Derecka, K., Flint, A. (2001). Trophoblast interferon and pregnancy. *Reproduction*, 121:41–49.
- Elli, M., Gaffuri, B., Frigerio, A., Zanadelli, M., Covini, D., Candiani, M., Vignli, M. (2001). Effect of a single dose of ibuprofen lysinate before embryo transfer on pregnancy rates in cows. *Reproduction*, 121:151–154.
- Farin, C.E., Imakawa, K., Hansen, T.R., McDonnell, J.J., Murphy, C.N., Farin, P.W., Roberts, R.M. (1990). Expression of trophoblastic interferon genes in sheep and cattle. *Biology of Reproduction*, 43:210–218.
- Garverick, H.A., Zollers, W.G., Smith, M.F. (1992). Mechanisms associated with corpus luteum lifespan in animals having normal or subnormal luteal function. *Animal Reproduction Science*, 28:111–124.
- Geisert, R.D., Zavy, M.T., Biggers, B.G., Garret, J.E., Wettemann, R.P. (1992). Characterization of the uterine environment during early conceptus expansion in the bovine. *Animal Reproduction Science*, 16:11–25.
- Guilbault, L. A., Thatcher, W. W., Drost, M., Haibel, G. K. (1987). Influence of a physiological infusion of prostaglandin F<sub>2α</sub> into postpartum cows with partially suppressed endogenous production of prostaglandins. 1. Uterine and ovarian morphological responses. *Theriogenology*, 27:931–946.
- Guzeloglu, A., Erdem, H., Saribay, M. K., Thatcher, W.W., Tekeli, T. (2006). Effect of timely flunixin meglumine treatment on pregnancy rates in Holstein heifers. *Reproduction of Fertility and Development*, 18:183–183.
- Malayer, J.R., Hansen, P.J., Gross, T.S. & Thatcher, W.W. (1990). Regulation of heat shock-induced alterations in the release of prostaglandins by the uterine endometrium of cows. *Theriogenology*, 34:219–30.
- Merrill, M. L., Ansotegui, R. P., Wamsley, N. E., Burns, P. D., Geary, T. W. (2003). Effects of flunixin meglumine on embryonic loss in stressed beef cows. *Proceedings of the*

- Western Section of the American Society of Animal Sciences*, 54:53-55.
- Odensvik, K., Gustafsson, H., Kindahl, H. (1998). The effect on luteolysis by intensive oral administration of flunixin granules in heifers. *Animal Reproduction Science*, 50:35-44.
- Pfeifer, L.F.M., Schneider, A., Silva, Neto, J.W., Ziguer, E.A., Dionello, N.J.L., Corrêa, M.N. (2008). Avaliação biológica e econômica do uso de flunixin meglumine em vacas e novilhas de corte inseminadas em tempo fixo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 37:1392-1397.
- Putney, D.J., Mullins, S., Thatcher, W.W., Drost, M., Gross, T.S. (1989). Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between the onset of estrus and insemination. *Animal Reproduction Science*, 19:37-51.
- Roberts, R. M., Cross, J. C., Leman, D. W. Interferons as hormones of pregnancy. (1992). *Endocrine Reviews*, 13:432-452.
- Santos, J.E.P., Thatcher, W.W., Chebel, R.C., Cerri, R.L.A., Galvão, K.N. (2004). The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Animal Reproduction Science*, 82-83:513-535.
- Scenna, F. N., Edwards, J. L., Rohrbach, N. R., Hockett, M. E., Saxton, A. M., Schrick, F. N. (2004). Detrimental effects of prostaglandin F2alpha on preimplantation bovine embryos. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 73:215-226.
- Schrack, F.N., Inskeep, E.K., Butcher, R.L. (1993). Pregnancy rates for embryos transferred from early postpartum beef cows into recipients with normal estrous cycle. *Biology of Reproduction*, 49:617-21.

Recebido em Dezembro 8, 2015

Aceito em Janeiro 11, 2016

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.