

Tratamento com Flunixin meglumine não previne efeitos do benzoato de estradiol sobre a função luteal durante a resincronização precoce de vacas leiteiras¹

Regiclei Lacerda Sequeto ²
Rafael Augusto Anuniação ³
Luiz Sérgio Almeida Camargo ⁴
Jeferson Ferreira Fonseca ⁵
João Henrique Moreira Viana ⁶
Carlos Antônio Carvalho Fernandes ⁷
Luiz Gustavo Bruno Siqueira ^{4,8}

Resumo: Os objetivos foram 1) determinar se o tratamento com benzoato de estradiol (BE) e implante de progesterona (P4) no D12 alteram o estradiol (E2) circulante e afetam a função do corpo lúteo (CL; P4 plasmática); 2) avaliar se o tratamento com flunixin meglumine (FLU) poderia prevenir efeitos negativo do BE sobre o CL. Vacas em lactação Holandês x Gir (n=45) foram submetidas a protocolo de sincronização da ovulação à base de BE e P4 (D-10: 2 mg BE+ implante de P4; D-2: remoção do implante+PGF2 α ; D-1: 1 mg BE; D0: estro). No D12, as vacas foram divididas aleatoriamente em quatro grupos/tratamentos: A) controle (CTL), salina im; B) 2 mg BE im, implante de P4 (BE-P4); C) 2 mg BE im, implante de P4, 1.1 mg/Kg FLU im (BE-P4-FLU); e D) implante de P4 no D12, remoção do folículo dominante por OPU no D15 (OPU-P4). Amostras de sangue foram coletadas diariamente e o plasma armazenado a -20°C. RIA em fase-sólida foi utilizado para dosagens diárias de P4 (D12 a D22) e estradiol plasmático a cada 48h (D13 a D21). Os dados foram analisados pelo PROC MIXED do SAS para medidas repetidas. Foram analisados efeitos de grupo, dia do ciclo, e sua interação. Foram observados efeitos de grupo (P=0,0075 e P=0,0068), dia do ciclo (P<0,0001 e P<0,001), e interação grupo*dia (P=0,0001 e P=0,0012) para E2 e P4, respectivamente. No D13, BE-P4 e BE-P4-FLU tiveram maior E2 comparados com OPU-P4 e CTL (21,7 \pm 2,7; 18,0 \pm 3,4 vs 3,7 \pm 0,9; e 8,76 \pm 6,3 pg/mL, respectivamente; P<0,001). O E2 plasmático não diferiu entre grupos e dia do ciclo a partir do D15. A P4 plasmática decresceu do D12 ao D22 em todos os grupos, mas a taxa de redução diferiu. Em grupos que receberam BE, P4 diminuiu do D12 até atingir concentrações significativamente menores no D17 (3,6 \pm 0,3 vs 1,4 \pm 0,2 ng/mL e 4,2 \pm 0,4 vs 1,9 \pm 0,4 ng/mL para BE-P4 e BE-P4-FLU, respectivamente; P<0,0001), enquanto P4 atingiu valores baixos somente no D20 no OPU-P4 (4,0 \pm 0,3 vs 1,5 \pm 0,3 ng/mL, D12 vs D20, respectivamente; P<0,0001) e D19 no CTL (3,1 \pm 0,4 vs 1,3 \pm 0,4 ng/mL, D12 vs D19; P=0,0045). No grupo OPU-P4, o pico de P4 foi no D17 (4,0 \pm 0,6 ng/mL) e permaneceu alta no D18 (3,2 \pm 0,5), maior (P<0.03) do que nos grupos BE-P4 (1,4 \pm 0,2 e 1,0 \pm 0,2; D17 e D18) e BE-P4-FLU (1,9 \pm 0,4 e 1,3 \pm 0,4; respectivamente). Conclui-se que a resincronização com BE no D12 aumenta o E2 plasmático no D13 e pode ter antecipado a luteólise funcional. Tratamento concomitante com FLU não impediu este efeito.

¹ O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil: (a) Parte do projeto "Estratégias para melhoria do desempenho reprodutivo em rebanhos leiteiros baseadas no uso de ultrassonografia Doppler e resincronização super-precoce após a Inseminação Artificial em Tempo Fixo", liderado por Luiz Gustavo Bruno Siqueira.

² Graduando em Medicina Veterinária – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora. e-mail: regiclei.sequeto@estudante.ufjf.br

³ Doutorando em Reprodução, Sanidade e Bem-Estar Animal – Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas. e-mail: anuniacaoveterinario@gmail.com

⁴ Pesquisador – Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora. e-mail: luiz.camargo@embrapa.br; luiz.siqueira@embrapa.br

⁵ Pesquisador – Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral. e-mail: jeferson.fonseca@embrapa.br

⁶ Pesquisador – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília. e-mail: henrique.viana@embrapa.br

⁷ Professor-Doutor – Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas. e-mail: carlos@biotran.com.br

⁸ Orientador

Palavras-chave: bovinos, corpo lúteo, resincronização

Flunixin meglumine treatment does not prevent effects of estradiol benzoate upon luteal function during early resynchronization in dairy cows

Abstract: Objectives were to 1) determine whether estradiol benzoate (EB) and a progesterone device (P4) given on D12 would change circulating estradiol (E2) and disturb corpus luteum (CL) function (plasma P4); 2) evaluate whether flunixin meglumine (FLU) treatment could prevent presumed detrimental effects of EB on CL. Lactating Holstein x Gir cows (n=45) were submitted to an EB-P4-based ovulation synchronization protocol (D-10: 2 mg EB+P4 intravaginal device; D-2: device removal+PGF2 α ; D-1: 1 mg EB; D0: estrus). On D12, cows were randomly allocated into four groups/treatments: A) control (CTL), saline im; B) 2 mg EB im, P4 device (EB-P4); C) 2 mg EB im, P4 device, 1.1 mg/Kg FLU im (EB-P4-FLU); and D) P4 device on D12, dominant follicle ablation by OPU on D15 (OPU-P4). Blood samples were collected daily and plasma was stored at -20° C. Solid-phase RIA was used to determine daily plasma P4 (D12 to D22; Immuchem, ICN Pharmaceuticals Inc, Costa Mesa, CA) and plasma E2 at 48h-intervals (D13 to D21; Ultra-sensitive Estradiol, Beckman Coulter Inc, Brea, CA). Data were analyzed using PROC MIXED of SAS accounting for repeated measures. Main effects were group, day of cycle, and their interaction. Overall, we observed an effect of group (P=0.0075 and P=0.0068), day of cycle (P<0.0001 and P<0.001), and interaction group*day (P=0.0001 and P=0.0012) for both E2 and P4, respectively. On D13, EB-P4 and EB-P4-FLU had higher E2 compared with OPU-P4 and CTL (21.7 \pm 2.7, 18.0 \pm 3.4 vs 3.7 \pm 0.9, and 8.76 \pm 6.3 pg/mL, respectively; P<0.001). Plasma E2 did not differ among groups or days from D15 onwards. Plasma P4 decreased from D12 to D22 in all groups; however, the rate of decrease differed. In groups receiving EB, P4 decreased from D12 to reach significant lower values on D17 (3.6 \pm 0.3 vs 1.4 \pm 0.2 ng/mL and 4.2 \pm 0.4 vs 1.9 \pm 0.4 ng/mL for EB-P4 and EB-P4-FLU, respectively; P<0.0001), whereas plasma P4 decreased to lower values only on D20 in OPU-P4 (4.0 \pm 0.3 vs 1.5 \pm 0.3 ng/mL, D12 vs D20, respectively; P<0.0001) and D19 in CTL (3.1 \pm 0.4 vs 1.3 \pm 0.4 ng/mL, D12 vs D19; P=0.0045). In OPU-P4, plasma P4 peaked on D17 (4.0 \pm 0.6 ng/mL) and remained high on D18 (3.2 \pm 0.5), greater (P<0.03) than for EB-P4 (1.4 \pm 0.2 and 1.0 \pm 0.2; D17 and D18) and EB-P4-FLU (1.9 \pm 0.4 and 1.3 \pm 0.4, respectively). In conclusion, resynchronization using EB on D12 increased plasma E2 on D13 and may have anticipated functional luteolysis. Concomitant FLU treatment did not prevent this effect.

Keywords: bovine, corpus luteum, resynchronization

Introdução

O uso de protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) tem proporcionado melhorias no desempenho reprodutivo e produtivo dos rebanhos, por meio da redução do IP e do ganho genético (Baruselli, 2016). No entanto, os protocolos convencionais só permitem a re-inseminação de fêmeas não-gestantes após o diagnóstico de gestação, i.e., 30 a 40 dias após a 1ª IATF. O diagnóstico precoce junto com a resincronização para IATF, seguido de re-inseminação reduz o intervalo entre inseminações com potencial melhoria da eficiência reprodutiva (Fricke *et al.*, 2003). No entanto, há de se considerar que o estabelecimento e manutenção da gestação em bovinos dependem da presença de um CL funcional e ativo, produzindo progesterona (P4; Mann e Lamming, 2001). O período crítico de reconhecimento materno da gestação acontece em torno de 14 a 18

dias após o estro, momento em que o Interferon-tau produzido pelo embrião deve agir para prevenir a luteólise e possibilitar a manutenção da gestação (Thatcher *et al.*, 1986). O uso de estradiol e P4 exógenos no início do protocolo de IATF durante o diestro (D12 a 14) pode provocar efeitos deletérios sobre o CL, visto que o estradiol poderia induzir pulsos de liberação de PGF2 α (Pugliesi *et al.*, 2011) e, conseqüentemente, luteólise precoce antes do reconhecimento materno da gestação. O flunixin meglumine, assim como outros anti-inflamatórios não esteroidais possui ação inibidora da enzima prostaglandina sintase e poderia, potencialmente, reverter os efeitos deletérios do estradiol sobre o CL (Odensvik *et al.*, 1998). Nesse contexto, a hipótese deste estudo foi que a administração de flunixin meglumine (FLU) no dia 12 do ciclo estral (diestro), concomitante ao tratamento com benzoato de estradiol (BE) e P4 exógenos para ressincronização super-precoce, seria capaz de mitigar possíveis efeitos deletérios destes hormônios sobre a funcionalidade do CL. Os objetivos foram: 1) determinar os efeitos do benzoato estradiol e progesterona exógenos administrados durante o diestro sobre as concentrações plasmáticas de estradiol (E2) e características funcionais do CL (concentração de progesterona; P4) em vacas em lactação; 2) avaliar a eficácia do tratamento com flunixin meglumine no dia 12 do ciclo para prevenir alterações na função luteal durante a fase de diestro.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Campo Experimental José Henrique Bruschi, na Embrapa Gado de Leite, localizado em Coronel Pacheco, MG. Vacas em lactação, multíparas (n=45) foram submetidas a um protocolo convencional de sincronização da ovulação conforme a seguir: Dia -10, aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol (BE) i.m. e inserção de implante intravaginal de P4; Dia -2, retirada do implante e aplicação de 0,5 mg de cloprostenol sódico (PGF); Dia -1, aplicação de 1 mg de BE; Dia 0, estro. No dia 12 após o estro, as vacas foram alocadas em quatro grupos seguindo delineamento inteiramente casualizado, para receberem os seguintes tratamentos: A) controle (CTL), salina i.m.; B) 2 mg BE i.m., implante de P4 (BE-P4); C) 2 mg BE i.m., implante de P4, 1,1 mg/Kg flunixin meglumine i.m. (BE-P4-FLU); e D) implante de P4 no Dia 12 e aspiração do folículo dominante por OPU no Dia 15 (OPU-P4).

Amostras de sangue foram coletadas diariamente entre os dias 12 e 22, o plasma foi recuperado e armazenado em freezer a -20° C para posterior dosagem das concentrações plasmáticas de progesterona e estradiol por radioimunoensaio (RIA) em fase sólida. As concentrações de P4 plasmática foram dosadas em amostras diárias (Dia 12 a Dia 22) utilizando kit comercial com 125I (ImmuChem, ICN Pharmaceuticals Inc, Costa Mesa, CA) e as concentrações plasmáticas de E2 foram determinadas a cada 48h (Dia 13 a Dia 21), também utilizando kit comercial com 125I (Ultra-sensitive Estradiol, Beckman Coulter Inc, Brea, CA).

Os dados foram analisados utilizando o PROC MIXED do software SAS, incluindo o comando REPEATED para considerar as medidas repetidas no tempo (dias do ciclo). O modelo estatístico considerou os seguintes efeitos principais: grupo/tratamento, dia do ciclo, e interação grupo*dia do ciclo.

Resultados e Discussão

De forma geral, foram observados efeitos significativos de grupo ($P=0,0075$ e $P=0,0068$), dia do ciclo ($P<0,0001$ e $P<0,001$), e interação grupo*dia ($P=0,0001$ e $P=0,0012$) tanto para E2 quanto para P4, respectivamente. Os resultados são apresentados como média±EPM. As concentrações de E2 estão demonstradas na Figura 1A. No dia 13, os grupos BE-P4 e BE-P4-FLU tiveram concentrações de E2 mais altas, comparados com os grupos OPU-P4 e CTL. Em todos os grupos, a concentração de E2 decresceu rapidamente entre os dias 13 e 15 ($P<0,0001$) e permaneceu em valores baixos do dia 15 em diante, não diferindo entre grupos nesses dias. As concentrações plasmáticas de P4 estão demonstradas na Figura 1B. Os valores de P4 plasmática decresceram em função do tempo em todos os grupos ($P<0,001$). Contudo, a taxa de redução diferiu entre grupos. Em relação do dia 12 dia ciclo, a P4 atingiu valores significativamente mais baixos no dia 17 em ambos os grupos BE-P4 ($P<0,0001$) e BE-P4-FLU ($P<0,0001$). Em contraste, concentrações de P4 significativamente menores só foram observadas no dia 20 nas vacas do grupo OPU-P4 ($P=0,0002$) e no Dia 19 nas vacas do grupo CTL ($P=0,02$). Interessante destacar que, no grupo OPU-P4, a concentração plasmática de P4 atingiu um pico no Dia 17 e permaneceu alta no Dia 18, valores significativamente mais altos ($P<0,03$) comparados aos grupos BE-P4 e BE-P4-FLU. No grupo CTL, os valores de P4 foram intermediários e não diferiram dos outros grupos.

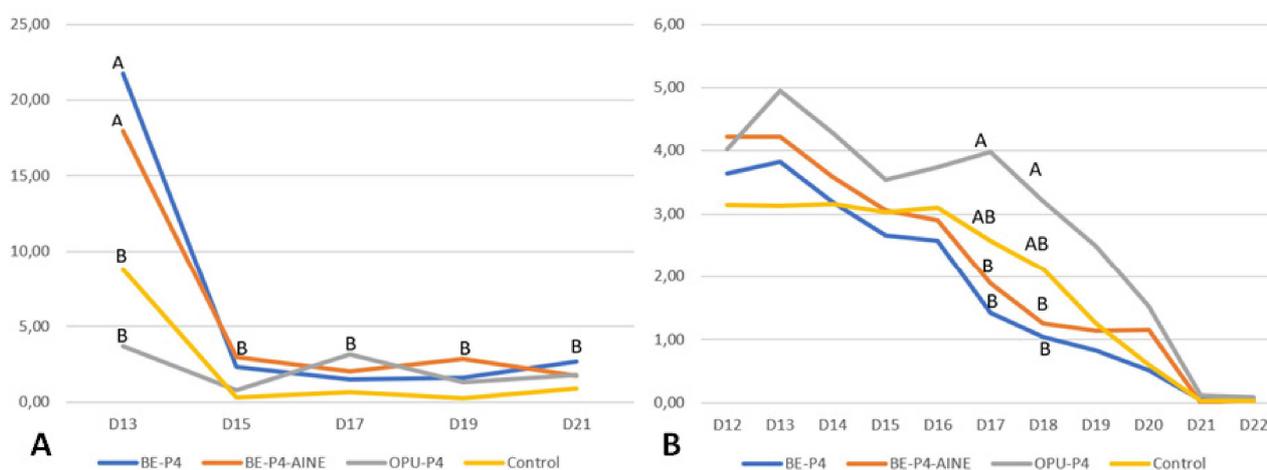


Figura 1A e B. Concentrações plasmáticas de estradiol (E2) do dia 13 ao dia 21 do ciclo estral (Fig. 1A) e de progesterona (P4) do dia 12 ao dia 22 do ciclo estral (Fig. 1B) em vacas submetidas a ressinchronização super-precoce com benzoato de estradiol (BE) e implante intravaginal de progesterona (P4), tratadas ou não com flunixin meglumina. Os grupos controle e OPU-P4 não receberam tratamento hormonal com BE.

A ressinchronização super-precoce iniciada no diestro é uma potencial estratégia para reduzir o intervalo entre inseminações e, portanto, melhorar a eficiência reprodutiva. Essas estratégia agressiva, no entanto, implica no uso de benzoato de estradiol (BE) e implante de progesterona (P4) durante o diestro e pode afetar a função do CL. O flunixin meglumina poderia prevenir esses efeitos negativos, prevenindo a secreção de PGF. Neste estudo, contudo, o flunixin meglumina não foi capaz de inibir efeitos da alta de E2 circulante sobre a função do CL (P4 plasmática). Os grupos tratados com BE tiveram antecipação da luteólise funcional, o que potencialmente afetaria o reconhecimento materno da gestação.

Conclusões

Ressinchronização utilizando BE no Dia 12 aumentou o E2 plasmático no Dia 13 e antecipou a luteólise funcional. O tratamento concomitante com flunixin não preveniu este efeito.

Agradecimentos

Os autores agradecem os funcionários do Campo Experimental José Henrique Bruschi, da Embrapa Gado de Leite, pelo auxílio durante a realização do experimento.

Referências

BARUSELLI, P. S. IATF supera dez milhões de procedimentos e amplia o mercado de trabalho. **Revista CFMV**, v. 69, p.57-60, 2016.

FRICKE, P. M., CARAVIELLO, D. Z., WEIGEL, K. A., WELLE, M. L. Fertility of dairy cows after resynchronization of ovulation at three intervals following first timed insemination. **Journal of Dairy Science**; v. 86, p. 3941-3950, 2003.

MANN, G. E., LAMMING, G. E. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. **Reproduction**, v. 121, p. 175-80, 2001.

ODENSVIK, K., GUSTAFSSON, H., KINDAHL, H. The effect on luteolysis by intensive oral administration of flunixin granules in heifers. **Anim Reprod Sci**, v. 50, p. 35-44, 1998.

PUGLIESI, G., SHRESTHA, H. K., HANNAN, M. A., CARVALHO, G. R., BEG, M. A., GINTHER, O. J. Effects of inhibition of prostaglandin F_{2α} biosynthesis during preluteolysis and luteolysis in heifers. **Theriogenology**, v. 76, p. 640-651, 2011.

THATCHER, W. W., BAZER, F. W., SHARP, D. C., ROBERTS, R. M. Interrelationships between uterus and conceptus to maintain corpus luteum function in early pregnancy: sheep, cattle, pigs and horses. **J Anim Sci.**, v. 62, p. 25-46, 1986.