

## Efeito da aplicação de flunixin meglumine sobre a taxa de gestação de ovelhas inseminadas via transcervical

Effect of Flunixin Meglumine Injection on Pregnancy Rate of Ewes Inseminated by Transcervical Technique

Luiz Francisco Machado Pfeifer<sup>1</sup>, Viviane Rohrig Rabassa<sup>1</sup>, José Wilson da Silva Neto<sup>1</sup>, Lucas de Carli Meneghello<sup>1</sup>, Eduardo Madeira Castilho<sup>1</sup>, Neimar Correa Severo<sup>2</sup> & Marcio Nunes Corrêa<sup>1</sup>

### ABSTRACT

**Background:** In livestock animals, which artificial insemination (AI) is widely spread, a healthy uterine environment is an important factor that should be taken into account for an adequate fertilization and establishment and development of pregnancy. The main limitation to spread the frozen semen insemination in sheep is the high costs of the laparoscopy AI and the difficulty of traversing the cervix. To overcome problems associated with transcervical artificial insemination, new techniques and instruments have been proposed. The manipulation of cervix during transcervical artificial insemination in sheep can lead to a local inflammatory reaction that releases inflammatory mediators, such as prostaglandins and cytokines, that either can negatively affect the uterine environment and consequently, the conception. In this regard, the injection of a non-steroidal anti-inflammatory (NSAI) at the moment of AI could reduce the secretion of inflammatory mediators, promoting a healthier uterine environment favorable to conception. The flunixin meglumine is a NSAI which reduces the synthesis of  $\text{PGF}_2\alpha$  by the inhibition of the cyclooxygenase. The objective of this study was to evaluate the effect of flunixin meglumine (non-steroid anti-inflammatory) injection on pregnancy rate of ewes inseminated by the transcervical technique.

**Materials, Methods & Results:** In this experiment 69 pluriparous ewes were used, 29 in control group (CG) and 40 in flunixin meglumine group (FMG). The estrus detection was performed twice daily for 5 days. The ewes detected with paint in the low back were considered in estrus. The AI procedure was performed 8 h after the estrus detection. At the AI time, the ewes were separated according to body condition score in two experimental groups. The ewes of the FM Group were injected with 1.1 mg/Kg of flunixin meglumine, im, 1 h before the AI procedure. In order to locate the ostium, a vaginal speculum and a source of external light were used; whereas the fixation and traction of the ostium were performed with an Allis clamp, allowing the penetration of the semen applicator through the vagina and cervix. The insemination procedure was performed 8h after estrous detection. There was no difference ( $P > 0.05$ ) on the pregnancy rate between groups, whereas the Control group had 68.9% and the FM group had 60.0% of pregnancy.

**Discussion:** The result demonstrates that the local inflammatory reaction caused by the traction of cervix was not detrimental to uterine environment and fertilization, since a high pregnancy rate was detected in both groups. Although the hypothesis of this study was not supported by the results, the high pregnancy rate detected in this experiment was higher than the results normally detected. Several studies have shown low pregnancy rates when transcervical artificial insemination with frozen semen is used associated to protocols of estrous synchronization. The flunixin meglumine did not improve the pregnancy rate, probably due to the insemination procedure adopted, since the traction of the cervix were performed gently, and consequently minimized the tissue damage. Thus, the inflammatory reaction may not have been sufficiently extensive as to lead to alteration of the uterine environment. These results suggested that flunixin meglumine injection did not influence the conception when was used prior to the transcervical insemination.

**Descritores:** *cumulus oophorus*, expressão gênica, maturação *in vitro*, vitrificação.

**Keywords:** *cumulus oophorus*, gene expression, *in vitro* maturation, vitrification.

## INTRODUÇÃO

Em animais de produção, nos quais a inseminação artificial (IA) é amplamente utilizada, um adequado ambiente uterino é fator fundamental para que ocorra a fertilização e o estabelecimento da prenhez, principalmente em ovelhas inseminadas com sêmen congelado. As principais limitações da ampla utilização de sêmen congelado na IA de ovinos são os altos custos da IA laparoscópica [6] e a anatomia da cérvix, a qual apresenta anéis tortuosos e reduzido diâmetro de orifício [10], dificultando a realização da IA transcervical. Esta limitação pode ser minimizada pelo o emprego da técnica de fixação e tracionamento da cérvix [7], a qual apresenta como desvantagem as lesões na mucosa cervical causada pela pipeta inseminante [2], podendo levar a uma reação inflamatória local, prejudicial à concepção. Essa reação inflamatória causa um aumento na síntese de mediadores inflamatórios como prostaglandinas e citocinas, os quais, apesar de estarem envolvidos no processo natural de concepção, quando em níveis elevados, podem exercer efeitos deletérios sobre a fertilização. Neste contexto, a aplicação de um anti-inflamatório não esteróide (AINE) no momento da IA transcervical poderia diminuir a produção de mediadores inflamatórios, proporcionando um ambiente uterino mais favorável à concepção. Dentre esses está o flunixin meglumine, um potente AINE, que reduz a síntese de  $PGF_2\alpha$  pela inibição da enzima ciclo-oxigenase [11].

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da aplicação de flunixin meglumine uma hora antes da IA transcervical com sêmen congelado, sobre a taxa de gestação de ovelhas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado em propriedade localizada no município de Rosário do Sul/RS, durante a estação reprodutiva da espécie ovina (fevereiro/março), no ano de 2007. Foram utilizadas 69 ovelhas pluríparas, provenientes do cruzamento entre as raças Corriedale e Texel, entre dois e quatro anos de idade. Estas fêmeas foram mantidas em campo nativo, em manejo extensivo, apresentando condição corporal (CC) entre 1,5 e 4,0 [13].

Para utilização na inseminação artificial (IA) foi colhido e congelado o sêmen de um reprodutor da raça Corriedale. As colheitas foram realizadas através

de vagina artificial, utilizando somente aqueles ejaculados que apresentavam como parâmetros mínimos 70% de motilidade e 85% de espermatozoides normais pré-congelamento. Após o descongelamento, os parâmetros mínimos utilizados foram 40% de motilidade, vigor 4 e  $60 \times 10^6$  espermatozoides vivos por palheta [3]. O envase foi feito em palhetas de 0,25 mL, com concentração de  $150 \times 10^6$  espermatozoides, utilizando diluente a base de TRIS (tris-hidroximetil aminometano), frutose, ácido cítrico, gema de ovo, glicerol e antibióticos (penicilina G e di-hidroestreptomicina) [1]. A curva de resfriamento foi realizada através da queda da temperatura de 30°C para 5°C em 1,5 h, e a curva de congelamento através da manutenção das palhetas por 2 min em vapor de nitrogênio e posterior imersão em nitrogênio líquido, alcançando a temperatura de -196°C. As palhetas foram armazenadas em botijão de nitrogênio líquido, sendo descongeladas no momento da IA através de imersão em água a 37°C por 1 min.

Para a identificação de ovelhas apresentando cio natural, foram utilizados machos vasectomizados, numa proporção de 1:10 fêmeas, sendo que esses recebiam aplicação diária de tinta na região esternal. Todos os rufiões foram submetidos a exame andrológico para certificação de que se encontravam inférteis. A detecção de estro foi realizada duas vezes ao dia, durante 5 dias, sendo consideradas em estro aquelas ovelhas que apresentavam a garupa marcada de tinta. A IA foi realizada 8 h após a identificação do estro, sendo que as fêmeas foram distribuídas uniformemente por CC em dois grupos experimentais, sendo um grupo controle (GC; n=29) e um grupo tratado com 1,1 mg/Kg de flunixin meglumine<sup>1</sup> por via intramuscular, 1 h antes da IA (GFM; n=40).

A IA transcervical foi realizada com as fêmeas contidas em bretes para IA, sendo mantidas em estação. Para localização do óstio cervical, foram utilizados espéculo vaginal (tipo Collin) e fonte de luz<sup>2</sup>, sendo a fixação da cérvix e o seu tracionamento realizados com o auxílio de pinça Allis, permitindo a passagem do aplicador de sêmen<sup>3</sup> através dos anéis cervicais. A deposição do sêmen foi realizada no ponto de maior penetração do aplicador, sendo classificado o local de deposição em cervical superficial, cervical médio, cervical profundo e intrauterino [7]. As IA foram realizadas por três inseminadores que tiveram treinamento específico para a técnica. Para evitar a manipulação excessiva da cérvix, o procedimento de IA não ultrapassou o tempo máximo de

dois minutos, sendo realizada a deposição do sêmen no ponto máximo de penetração atingido neste período. Para auxiliar na passagem do aplicador pela cérvix até a chegada ao útero (quando possível), após o tracionamento da cérvix, o aplicador foi conduzido externamente (via vagina e cérvix) pelo dedo indicador da mão que segurava a pinça de tração, assim facilitando a transposição dos anéis.

O diagnóstico de gestação foi realizado através de ultrassonografia retal, utilizando sonda linear de 5 MHz<sup>4</sup>, 30 dias após a IA.

Para análise estatística dos resultados foram utilizados os testes de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e exato de Fisher, testando relações entre grupos (GC e GFM) e local de deposição do sêmen (superficial, médio, profundo e intrauterino) quanto à taxa de gestação.

### RESULTADOS

A taxa de gestação no GFM foi de 60,0%, enquanto que no GC foi de 68,9%, não havendo diferença entre os grupos ( $P > 0,05$ ).

Na Tabela 1 são demonstradas as frequências de distribuição do grau de penetração da cérvix e suas respectivas taxas de gestação em cada grupo experimental. Com a utilização da técnica de IA transcervical, através de fixação e tracionamento da cérvix, foram obtidas distribuições de frequência quanto ao grau de penetração da cérvix, de 15,9% cervical superficial, 13,0% cervical médio, 27,0% cervical profundo e 43,5% intra-uterino.

**Tabela 1.** Taxa de prenhez de 69 ovelhas pluríparas, (cruzamento entre as raças Corriedale e Texel, entre dois e quatro anos de idade) inseminadas por via transcervical, durante a estação reprodutiva da espécie ovina (fevereiro/março de 2007) em propriedade localizada em Rosário do Sul, RS, com ou sem aplicação de flunixin meglumine previamente à inseminação artificial, de acordo com o grau de penetração da cérvix.

Grau de penetração da cérvix	Grupo Controle (GC)	Grupo Flunixin Meglumine (GFM)	Taxa de gestação total (%)*
	Taxa de Prenhez (%)	Taxa de Prenhez (%)	
Superficial	6/6 (100,0)	3/5 (60,0)	81,8
Médio	4/5 (80,0)	4/4 (100,0)	88,9
Profundo	2/6 (33,3)	8/13 (61,5)	52,6
Intra-uterina	8/12 (66,7)	10/18 (55,5)	60,0
N	20/29	25/40	69

\*Valores não diferem significativamente ( $P > 0,05$ ).

### DISCUSSÃO

Os resultados quanto à taxa de gestação demonstraram que a reação inflamatória local resultante da tração da cérvix não prejudicou o ambiente uterino para a fertilização, pois uma alta taxa de gestação foi verificada em ambos os grupos. Apesar da hipótese deste trabalho não ter sido comprovada, até onde sabemos, este foi o primeiro estudo que registrou taxas de concepção acima de 55% em ovinos inseminados com sêmen congelado, tanto para o grupo tratado quanto para o grupo controle [12,14]. A maioria dos trabalhos publicados que utilizaram tração cervical para inseminação com sêmen congelado, utilizaram algum protocolo de sincronização para induzir os estros [8,12,14]. Desta forma, um dos problemas que pode estar relacionado com a baixa taxa de concepção, após IA com sêmen congelado em ovinos, é a qualidade do ovócito ovulado em protocolos de sincronização, já que no presente estudo altas taxas de gestação foram atingidas quando foi utilizado o cio natural das fêmeas.

Vários estudos [5,7,10,14] foram desenvolvidos na tentativa de identificar os fatores determinantes da variabilidade dos resultados obtidos com o uso da IA transcervical em ovinos. As citocinas liberadas durante a reação inflamatória exercem efeito sobre o endométrio ou oviduto, podendo acarretar na alteração do ambiente uterino para concepção, visto que a Interleucina-1 $\beta$  reduz a proliferação das células do parênquima endometrial [4], e o Interferon- $\alpha$  diminui a proliferação de células epiteliais do oviduto [9].

Quanto ao grau de penetração da cérvix, os resultados obtidos indicam que através dessa técnica é possível a obtenção de altas taxas de penetração profunda da cérvix ovina, bem como a possibilidade de IA intrauterina, concordando com o estudo de Halbert *et al.* [7], em que foram realizados os mesmos procedimentos de fixação e tracionamento da cérvix e obtida uma taxa de penetração uterina de 82%, porém utilizando aplicador de sêmen com a presença de uma ponta curva na sua extremidade.

O flunixin meglumine pode não ter apresentado melhores resultados neste estudo provavelmente devido ao procedimento de inseminação adotado, pois os procedimentos de tração de cérvix foram realizados com delicadeza, visando a minimizar os danos teciduais. Desta forma, a reação inflamatória pode não ter sido suficientemente extensa a ponto de ocasionar a alteração

do ambiente uterino. Pode-se observar que, quando a técnica de IA transcervical é realizada por inseminadores treinados e utilizando instrumentos adequados, pode ser minimizado o trauma exercido pela manipulação na mucosa da cérvix, sendo obtidas satisfatórias taxas de gestação. Assim, para que possa ser determinada com maior precisão os motivos da baixa taxa de concepção quando a inseminação artificial com sêmen congelado é realizada, são necessários mais estudos envolvendo a avaliação da competência ovocitária, dos métodos de congelamento de sêmen ovino e da eficiência dos tratamentos de sincronização de estro.

## CONCLUSÃO

Os resultados indicam que não há um incremento na taxa de gestação com a aplicação de flunixin meglumine uma hora antes da IA transcervical em ovinos.

## NOTAS INFORMATIVAS

<sup>1</sup>Banamine® - Schering Plough Saúde Animal, São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup>Lanterna de cabeça Skipper - Nautika, Brasil.

<sup>3</sup>Aplicador de sêmen ovinos/caprinos, 0,25 mL-IMV Technologies, L'Aigle, França.

<sup>4</sup>ANSER VET 450, Pie Medical, Stuart, FL, USA.

## REFERÊNCIAS

- 1 Anel L., de Paz P., Alvarez M., Chamorro C.A., Boixo J.C., Manso A., González M., Kaabi M. & Anel E. 2003. Field and *in vitro* assay of three methods for freezing ram semen. *Theriogenology*. 60(7): 1293-1308.
- 2 Campbell J.W., Harvey T.G. & McDonald M.F., Sparksman R.I. 1996. Transcervical insemination in sheep: an anatomical and histological evaluation. *Theriogenology*. 45(8): 1535-1544.
- 3 Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). 1998. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 49 p.
- 4 Davidson J.A., Tiemann U., Betts Jg. & Hansen P.J. 1995. DNA synthesis and prostaglandin secretion by bovine endometrial cells as regulated by interleukin-1. *Reproduction, Fertility and Development*. 7(5): 1037-1043.
- 5 Eppleston J., Salamon S., Moore N.W. & 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.
- 6 Evans G. & Maxwell W. 1987. *Salamon's artificial insemination of sheep and goats*. Sydney: Butterworths, 194 p.
- 7 Halbert G.W., Dobson H., Walton J.S. & Buckrell B.C. 1990. A technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. *Theriogenology*. 33(5): 993-1010.
- 8 Halbert G.W., Dobson H., Walton J.S., Sharpe P. & Buckrell B.C. 1990. Field evaluation of a technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. *Theriogenology*. 33(5): 1231-1243.
- 9 Kamwanja L.A. & Hansen P.J. 1993. Regulation of proliferation of bovine oviductal epithelial cells by estradiol: interactions with progesterone, interferon- $\tau$  and interferon- $\alpha$ . *Hormonal Metabolism Research*. 25(9): 500-502.
- 10 Kershaw C.M., Khalid M., McGowan M.R., Ingram K., Leethongdee S., Wax G. & 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.
- 11 Odensvik K., Cort N., Basu S. & Kindahl H. 1989. Effect of flunixin meglumine on prostaglandin F $2\alpha$  synthesis and metabolism in the pig. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 12(3): 307-311.
- 12 Rabassa V.R., Tabeleão V.C., Pfeifer L.F.M., Schneider A., Zieger E.A., Schossler E., Severo N.C., Del Pino F.A.B. & Corrêa M.N. 2007. Efeito das técnicas transcervical e laparoscópica sobre a taxa de gestação de ovelhas inseminadas em tempo-fixado. *Ciência Animal Brasileira*. 8(1): 127-133.
- 13 Russel A.J.F., Doney J.M. & Gunn R.G. 1969. Subjective assessment of body fat in sheep. *Journal Agricultural Science*. 72(3): 451-454.
- 14 Wulster-Radcliffe M.C. & Lewis G.S. 2002. Development of a new transcervical artificial insemination method for sheep: effects of a new transcervical artificial insemination catheter and traversing the cervix on semen quality and fertility. *Theriogenology*. 58(7): 1361-1371.