



## Efeito do flunixin meglumine e da somatotropina recombinante bovina sobre a taxa de prenhez de receptoras bovinas de embriões fecundados *in vitro*

[*Effect of flunixin meglumine and recombinant bovine somatotropin on pregnancy rates of recipients of bovine embryos produced in vitro*]

"Artigo Científico/Scientific Article"

HF Veloso Neto<sup>1</sup>, JCF Silva<sup>1</sup>, FABM Sales<sup>1</sup>, LC Pereira<sup>1</sup>, SRL Basto<sup>1</sup>,  
JCO Andrade<sup>2</sup>, MT Moura<sup>1</sup>, PF Lima<sup>1</sup>, MAL Oliveira<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biotecnologia aplicada à Reprodução Animal, DMV, UFRPE, Recife, PE, Brasil.

<sup>2</sup>Médico Veterinário Autônomo.

### Resumo

Avaliou-se o efeito da aplicação da somatotropina bovina (bST) e do flunixin meglumine (FM) sobre as taxas de prenhez de receptoras de embriões produzidos *in vitro* (PIV). Utilizou-se 110 novilhas mestiças com ciclo estral regular, peso médio de 350 kg e estado de condição corporal equivalente a 3. Os ovócitos das doadoras foram coletados por aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom e a produção dos embriões foi realizada pela empresa InVitro<sup>®</sup>. Imediatamente antes da transferência dos embriões, as receptoras foram avaliadas, por palpação retal, quanto à presença de corpo lúteo (CL) e em seguida foram aleatoriamente distribuídas em três grupos experimentais. Os animais do G1 (n = 30) serviram como controle. Os do G2 (n = 40) receberam 500 mg de bST por via subcutânea e os do G3 (n = 40) receberam 500 mg de FM por via intramuscular. Os embriões que se encontravam no 7º dia de cultivo foram depositados no terço final do corno uterino ipsilateral ao ovário com CL presente e em seguida realizada a administração do bST e do FM. As taxas de prenhez foram de 53,33% (G1), 60,00 (G2) e de 55,00% (G3) e as de perda embrionária foram de 6,37% (G1), 7,50% (G2) e de 7,50% (G3), não havendo diferença (P > 0,05). Os resultados permitem concluir que tanto o bST quanto o FM não contribuem para aumentar as taxas de prenhez e tampouco para reduzir a perda embrionária.

**Palavras Chave:** antiluteolítico, MIV, FIV, CIV, TE.

### Abstract

The work was aimed to test the effect of bovine somatotropin (bST) and flunixin meglumine (FM) treatment of recipient cows on pregnancy rates after transfer of *in vitro* produced (IVP) embryos. A total of 110 cycling crossbred heifers, with average weight of 350 kg and body condition score equivalent to 3 were used. The oocytes were collected from donor cows by ultrasound guided transvaginal follicular aspiration and *in vitro* embryo production was performed by InVitro<sup>®</sup> company. Immediately before embryo transfer, recipient cows were evaluated by rectal palpation for *corpus luteum* (CL) detection and were randomly allocated to three experimental groups. Animals of G1 (n = 30) were used as controls. Group G2 (n = 40) received 500 mg bST subcutaneously and G3 (n = 40) received 500mg de FM by an intramuscular shot. Embryos on day 7 of culture were deposited on the third portion of the ipsilateral uterine horn to the CL containing ovary followed by administration of bST and FM. Pregnancy rates were 53.33% (G1), 60.00% (G2) and 55.00% (G3) and embryonic loss were 6.37% (G1), 7.50% (G2) and 7.50% (G3), did not differ between groups (P > 0.05). The results allow the conclusion that bST and FM do not contribute to increase pregnancy rates and do not reduce embryonic loss.

**Key words:** antiluteolytic, IVM, IVF, ICV, ET.

\*Autor para correspondência/Corresponding author: Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Av. Dom Manuel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, CEP 52171-900.

E-mail: [maloufrpe@uol.com.br](mailto:maloufrpe@uol.com.br)

Recebido em: 01 de agosto de 2014.

Aceito em: 15 de setembro de 2014.

## Introdução

A produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos concretizou-se após o advento da aspiração folicular *in vivo* associado ao aperfeiçoamento das condições de cultivo *in vitro* (GONÇALVES et al., 2008). Além de rotineiramente utilizada em larga escala no Brasil (VIEIRA, 2012) tem contribuído para execução de estudos sobre clonagem, transgênese e transferência nuclear.

No entanto, o sucesso das transferências de embriões PIV ainda é limitado devido a problemas relacionados com as fêmeas receptoras (ANDRADE et al., 2012). Dentre eles, falha do reconhecimento materno da prenhez, ambiente uterino inadequado, assincronia entre embrião e útero, ou ainda alterações intrínsecas do embrião (HANSEN, 2006).

A mortalidade embrionária precoce é uma causa importante de falha reprodutiva em bovinos devido o impacto negativo sobre a economia da atividade pecuária, limitando a utilização comercial de biotécnicas aplicadas à reprodução (ERDEM e GUZELOGLU, 2010). Porcentagens de prenhez variando de 30 a 51% foram relatadas por HASLER (2000), FARIN et al. (2001), LANE et al. (2003), DIAS et al. (2006), SCHMIDT (2007) e ANDRADE et al. (2012).

Para minimizar as perdas embrionárias, estratégias de redução da capacidade luteolítica do útero materno e aumento do estímulo antiluteolítico do concepto foram sugeridas por BINELLI et al. (2001) e por SANTOS et al. (2004). Assim, objetivou-se avaliar as taxas de prenhez de receptoras bovinas inovuladas com embriões PIV, reduzindo a capacidade luteolítica do útero materno com o Flunixin meglumine (FM), bem como, por intermédio da somatotropina recombinante bovina (bST), aumentar a ação antiluteolítica do concepto por estimular seu crescimento com elevação do IGF-I circulante.

## Material e Métodos

Utilizou-se, como receptoras, 110

novilhas mestiças (Red Angus x Nelore) que apresentavam ciclo estral regular, peso médio de 350 kg e estado de condição corporal equivalente a 3, numa escala de 1 a 5, conforme classificação de LOWMAN et al. (1976). As fêmeas eram criadas em piquetes formados por *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria brizantha* CV. GM5, além de sal mineral proteinado e água *ad libitum*.

A aspiração folicular foi realizada por via transvaginal guiada por ultrassom. Os ovócitos aspirados foram classificados, segundo PALMA (2001), em escala variando de 1 a 4, colocados em meio de cultivo e transportados ao laboratório em incubadoras portáteis a 38,5 °C contendo 5% CO<sub>2</sub>. No laboratório foram transferidos para estufa de cultivo visando completar a maturação durante 24 horas. Posteriormente foram expostos aos espermatozóides e após a fecundação foram cultivados durante sete dias, conforme recomendação da empresa InVitro®. Finalizado o cultivo, os embriões selecionados foram aqueles classificados como grau 1, segundo WRIGHT (1998).

As receptoras foram submetidas ao protocolo de transferência de embrião em tempo fixo. Receberam, no dia zero (D0), o dispositivo intravaginal de progestágeno, juntamente com a administração intramuscular de 2 mg de benzoato de estradiol. No 7<sup>o</sup> dia (D7) foi administrado 200 UI de eCG + 0,150 mg de D-cloprostenol e no 8<sup>o</sup> (D8) procedeu-se a retirada do dispositivo com a aplicação de 0,5 mg de benzoato de estradiol por via intramuscular. No 17<sup>o</sup> (D17) foi realizada a transferência em tempo fixo pelo método não cirúrgico por técnico habilitado.

Imediatamente antes da transferência, as receptoras foram avaliadas, por palpação retal, quanto à presença de corpo lúteo (CL) e em seguida foram aleatoriamente distribuídas em três grupos experimentais. Os animais do G1 (n = 30) serviram como controle. Os do G2 (n = 40) receberam 500 mg de bST por via subcutânea e os do G3 (n = 40) receberam 500 mg de FM por via intramuscular. Os embriões do D7 foram depositados no terço final do corno uterino ipsilateral ao ovário

com CL presente e em seguida realizada aplicação do tratamento a ser testado.

O diagnóstico de prenhez foi realizado com aparelho ultrassonográfico, Mindray® DP2200Vet, no 35º e no 60º dia após a transferência.

As taxas de prenhez foram avaliadas pelo teste  $\chi^2$ , utilizando o programa StatPlus® (2009), considerando-se  $P < 0,05$  como significativo.

### Resultados

Na Tabela 1 constam os dados de prenhez obtidos no 35º e no 60º dia após a transferência dos embriões nos diferentes tratamentos experimentais. Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre as taxa de prenhez, tanto no diagnóstico efetuado no 35º quanto no 60º dia.

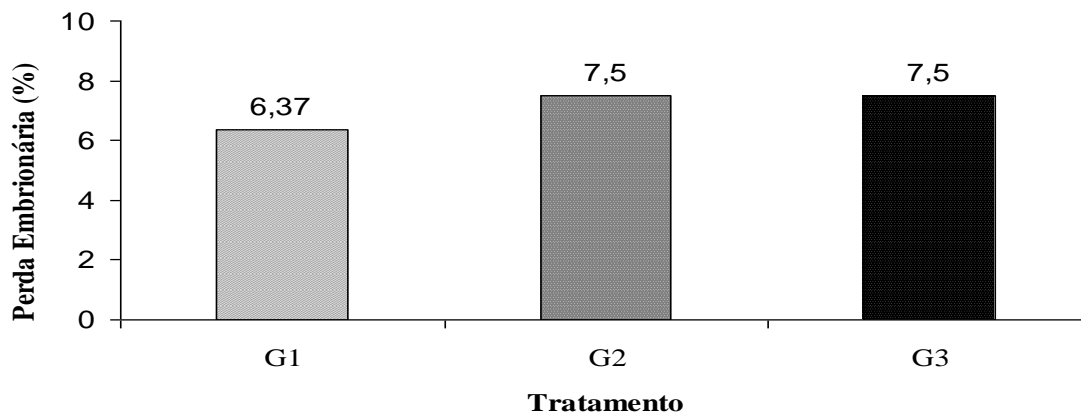
**Tabela 1.** Porcentagem de prenhez de receptoras de embriões produzidos *in vitro* distribuídas nos grupos Controle (G1), somatotropina recombinante bovina (G2) e Flunixin Meglumine (G3)

Tratamento	Nº de Embriões	P r e n h e z (dias)	
		35 n/n (%)	60 n/n (%)
G1	30	16/30 (53,33)	14/30 (46,66)
G2	40	24/40 (60,00)	21/40 (52,50)
G3	40	22/40 (55,00)	19/40 (47,50)

Resultado não significativo para  $P > 0,05$ .

A Figura 1 contém as porcentagens de perda embrionária. Nela, pode-se observar similaridade dos resultados entre os tratamentos experimentais após a

avaliação no 60º dia da transferência dos embriões. Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) das taxas de perda embrionária entre os grupos.



**Figura 1.** Porcentagem de perda embrionária no 60º dia de prenhez nos grupos Controle (G1), somatotropina recombinante bovina (G2) e Flunixin Meglumine (G3).

### Discussão

Existem relatos de BILBY et al. (1999) e de MOREIRA et al. (2002) evidenciando o aumento da taxa de prenhez após administração de 500 mg de bST durante o estro de vacas lactantes utilizadas como receptoras de embrião. Segundo esses autores, a aplicação de bST deve

incrementar as concentrações circulantes de bST e de IGF-1, desse modo, acelerar o desenvolvimento embrionário e aumentar o número de células trofoblásticas, bem como o da secreção de IFN- $\tau$  pelo embrião. Essa hipótese de aumento da secreção de IFN- $\tau$  foi respaldada por THATCHER et al. (2006).

Nesse trabalho, todavia, a administração do bST no momento da transferência de embrião não interferiu na taxa de prenhez e tal fato pode ter sido consequência do tipo de receptora de embrião utilizada. As concentrações de IGF-1 são normalmente elevadas em novilhas e superiores àquelas encontradas em vacas, como reportaram-se BILBY et al. (1999). Outra possível explicação para as diferenças entre os dados registrados na literatura e os aqui obtidos, pode ser consequência do estado fisiológico e metabólico das receptoras.

No caso das vacas leiteiras, o IGF-1 encontra-se em baixa concentração devido a lactação e a bST estimula o aumento de sua concentração, corrigindo o desequilíbrio tanto endócrino quanto metabólico, como mencionado por THATCHER et al. (2004). Por outro lado, BILBY et al. (1999) relataram que em novilhas, as concentrações de IGF-1 são normalmente superiores àquelas encontradas em vacas lactantes e, dessa forma, não respondem ao estímulo da bST de modo satisfatório. Portanto, se os embriões não são estimulados, não ocorre aumento das taxas de prenhez.

Outro aspecto a ser avaliado é que a aplicação do bST neste trabalho foi realizada no momento da transferência para minimizar o manejo das receptoras. No entanto, MOREIRA et al. (2002) e HASLER et al. (2003) recomendam que a administração do bST em vacas seja realizada antes da transferência dos embriões para que as concentrações de bST e IGF-1 no útero estejam elevadas no momento da transferência, garantindo um ambiente uterino capaz de estimular o desenvolvimento embrionário, com consequente aumento na taxa de prenhez. Contudo, os resultados de HAAS et al. (2007) e COSTA et al. (2011) respaldam os dados desse trabalho tendo em vista aplicarem a bST durante o estro e também não terem observado aumento da taxa de prenhez.

A aplicação de 500 mg de FM para inibir a transformação do ácido aracdônico do endométrio em PGF2 $\alpha$ , imediatamente

antes da transferência, também não apresentou influência sobre a taxa de prenhez do grupo tratado. Elevadas concentrações de prostaglandina F2 $\alpha$  no lúmen uterino podem ser responsáveis por perdas embrionárias precoces (SCENNA et al., 2004), além da manipulação uterina no momento da transferência de embrião que tem sido responsabilizada por aumentar a liberação de PGF2 $\alpha$ , conforme citações de WANN e RANDEL (1990), VELEZ et al. (1991) e SCENNA et al. (2005).

SCHRICK et al. (2001) relatam que o efeito do FM na taxa de prenhez depende da qualidade embrionária, estágio de desenvolvimento do embrião transferido e se fresco ou congelado. SCENNA et al. (2005) verificaram que o tratamento com FM não altera as taxas de prenhez dos embriões de qualidade I, melhorando somente as taxas dos embriões de qualidade II. Ainda sugerem que embriões de qualidade II são mais sensíveis aos efeitos deletérios da PGF2 $\alpha$ . O resultado positivo desse trabalho pode ser creditado ao fato de terem sido, exclusivamente, utilizados embriões de qualidade I, possivelmente menos sensíveis aos efeitos da ação da PGF2 $\alpha$ .

A não constatação de perda embrionária significativa deve-se, provavelmente, ao fato dos embriões transferidos apresentarem homogeneidade tanto no que concerne ao seu grau de desenvolvimento quanto a sua qualidade. Neste trabalho foram utilizados, exclusivamente, embriões do 7<sup>o</sup> dia de cultivo que se encontravam no estágio de blastocisto e que tenham sido classificados como grau I. A utilização desse tipo de embrião permitiu uma análise mais precisa dos achados, bem como corroborou com os dados de ANDREOTI et al. (2009) ao relatarem que a perda embrionária esperada é diretamente relacionada ao seu grau de desenvolvimento.

O trabalho foi submetido e aprovado pela CEUA-UFRPE sob licença nº 009/2012, obedecendo às normas do comitê de ética e experimentação animal.

## Referências

- ANDRADE, G.A. et al. Fatores que afetam a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.36, n.1, p.66-69, 2012.
- ANDREOTTI, M. et al. Taxa de prenhez de embriões bovinos tardios transferidos no dia 8 de cultivo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 18., 2009, Belo Horizonte. Anais...Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2009. v.18, p.352-352.
- BILBY, C.R. et al. Plasma GH, IGF-1, and conception rate in cattle treated with low doses of recombinant bovine GH. **Theriogenology**, Los Altos, v.1, p.1285-1296, 1999.
- BINELLI, M. et al. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, Los Altos, v. 56, p.1451-1463, 2001.
- COSTA, E.P. et al. Uso da rbst no dia do estro em receptoras de embrião bovino criopreservado, **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.12, n.4, p. 712 – 717, 2011.
- DIAS C.C. et al. Fatores relacionados ao embrião e à receptora que influenciam o sucesso das transferências de embriões de coleta convencional ou de fertilização *in vitro*. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.34, p.412, 2006.
- ERDEM, H.; GUZELOGLU, A. Effect of Meloxicam Treatment during Early Pregnancy in Holstein Heifers. **Reproduction Domestic Animals**, Berlin, v.45, p.625-628 2010.
- FARIN P.W. et al. Influence of *in vitro* systems on embryo survival and fetal development in cattle. **Theriogenology**, Los Altos, v.55, p.151-170, 2001.
- GONÇALVES, P.B.D. et al. Produção *in vitro* de embriões bovinos, **Ciência Veterinária nos Trópicos**, Recife, v. 11, s. 1, p.135-138, 2008.
- HAAS, G.T.S. et al. Taxa de prenhez e concentração sérica de progesterona em novilhas receptoras de embrião tratadas com somatotropina recombinante bovina (rbst). **Revista Ceres**, Viçosa, v.54, n.311, p.26-32, 2007.
- HANSEN, P.J. Realizing the promise of IVF in cattle - an overview **Theriogenology**, Los Altos, v.65, p.119-125, 2006.
- HASLER, J.F. *In vitro* culture of bovine embryos in Ménézo's B2 medium with or without coculture and serum: the normalcy of pregnancies and calves resulting from transferred embryos. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60, p.81-91, 2000.
- HASLER, J.F. et al. Effect of recombinant bovine somatotropin on superovulatory response and recipient pregnancy rates in a commercial embryo transfer program. **Theriogenology**, Los Altos, v.59, p.1919-1928, 2003.
- LANE M. et al. Use of G1.2/G2.2 media for commercial bovine embryo culture: equivalent development and pregnancy rates compared to co-culture. **Theriogenology**, Los Altos, v.60, p.407-419, 2003.
- LOWMAN, B.G.N. et al. **Condition scoring of cattle**. Edinburgh: East of Scotland College of Agriculture, 1976. 8p.
- MOREIRA, F. et al. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. **Theriogenology**, Los Altos, v.57, p.1371-1387, 2002.
- PALMA G.A. **Biotecnología de la reproducción**. Balcarce: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuária, 2001, 701p.
- SANTOS, J.E.P. et al. Effect of bST and reproductive management on reproductive and lactational performance of Holstein dairy cows. **Journal Dairy Science**, v.87, p.868-881, 2004.
- SCHMIDT M. Perinatal death associated with ET, IVP and cloning in cattle. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Upsala, v.49, p.13, 2007.
- SCHRICK, F.N. et al. Administration of a prostaglandin inhibitor immediately prior to embryo transfer improves pregnancy rates in cattle. **Theriogenology**, Los Altos, v.55, p.370, 2001.
- SCENNA, F.N. et al. Detrimental effects of prostaglandin F2 alpha on preimplantation bovine embryos. **Prostaglandins & Other Lipid Mediat**, v.73, p.215-226, 2004
- SCENNA, F.N. et al. Influence of a prostaglandin synthesis inhibitor administered at embryo transfer on pregnancy rates of recipient cows. **Prostaglandins & other Lipid Mediators**, v.78, p.38-45, 2005.
- THATCHER, W.W. et al. Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. **Theriogenology**, Los Altos, v.65, p.30-44, 2006.
- THATCHER, W.W. et al. Utilização de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) como estratégia para aumentar a taxas de prenhez em vacas leiteiras em lactação. In: VIII NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 2004, Uberlândia. **Anais...** 2004. Uberlândia: CONAPEC, 2004, p.3-17.
- VELEZ, J.S. et al. Effect of uterine

manipulation on postpartum fertility and plasma 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F2 in Brahman cows and first-calf heifers. **Theriogenology**, Los Altos, v.36, p.987-997, 1991.

VIEIRA, R. J. Biotécnicas aplicadas à reprodução bovina: generalidades. **Ciência Animal**, Fortaleza, v.22, n.1 p.55-65, 2012.

WANN, R.A.; RANDEL, R.D. Effect of uterine manipulation 35 days after parturition on plasma concentrations of 13,14-dihydro-15-keto prostaglandin F2 in multiparous and primiparous brahman cows. **Journal of Animal Science**, Londres, v.68, p.1389-1394, 1990.

WRIGHT J.M. Photographic illustrations of embryo developmental stage and quality scores. In: Stringfellow, D.A. **Manual of the International Embryo Transfer Society**. Savoy: Seidel SM (Ed.), 1998. 3.ed., p.167-170.