

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

INFLUÊNCIA DA FLUNIXINA MEGLUMINA E DO FIROCOXIB NA FASE
LÚTEA DE FÊMEAS BUBALINAS (*Bubalus bubalis* Linnaeus, 1758)
RECEPTORAS DE EMBRIÕES

ANDRESSA FILAZ VIEIRA

Botucatu – SP
Setembro de 2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

INFLUÊNCIA DA FLUNIXINA MEGLUMINA E DO FIROCOXIB NA
FASE LÚTEA DE FÊMEAS BUBALINAS (*Bubalus bubalis* Linnaeus,
1758) RECEPTORAS DE EMBRIÕES

ANDRESSA FILAZ VIEIRA

Dissertação apresentada junto ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia Animal para
obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Titular Eunice Oba

Botucatu – SP
Setembro de 2021

FICHA CATALOGRÁFICA

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Vieira, Andressa Filaz.

Influência da fluxinina meglumina e do firocoxib na fase lútea de fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis* Linnaeus, 1758) receptoras de embriões / Andressa Filaz Vieira. - Botucatu, 2021

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Eunice Oba

Capes: 50504002

1. Búfalos. 2. Corpus lúteo. 3. Ultrassonografia veterinária. 4. Anti-Inflamatórios. 5. Sincronização do estro.

Palavras-chave: Anti-inflamatório; Búfala; Corpus lúteo; Estro sincronização; Ultrassonografia.

Nome da autora: Andressa Filaz Vieira

Título: Influência da flunixinina meglumina e do firocoxib na fase lútea de fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis* Linnaeus, 1758) receptoras de embriões.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^ª. Titular Eunice Oba
Orientadora
Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal
FMVZ – UNESP – Botucatu

Dr. Guilherme Rizzoto
Membro
Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^ª. Dr^ª. Ariana Dantas
Membro
ETEC, Sebastiana de Barros, São Manuel, São Paulo.

Data da defesa: 30 de setembro de 2021.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por esta graça em minha vida.

À minha mãe, Marilza Filaz Vieira, que é a minha heroína e minha fortaleza, e nunca mediu esforços para que eu chegasse até aqui. Ao meu pai, Adenízio Pinto Vieira, que apesar de todas as dificuldades, sempre me apoiou e esteve ao meu lado.

Ao meu irmão, Anderson Pinto Vieira, que sempre foi meu espelho de vida e sempre me incentivou e me apoiou. A minha cunhada Roberta Lima Vieira que sempre me apoio e me ajudou, e a minha sobrinha Maria Bia, que é a alegria e sentido das nossas vidas. Sem vocês eu nunca teria conseguido chegar até onde cheguei. Minha eterna gratidão a todos vocês e espero que algum dia eu possa retribuí-los tudo o que fizeram por mim. Amo vocês para todo sempre.

À minha orientadora, Prof^a. Titular Eunice Oba, que além de orientadora sempre foi uma “MÃE”, e nunca mediu esforços para me ajudar. Você é uma mulher incrível e guerreira demais e saiba que tenho um grande amor, admiração e minha consideração, que será pelo resto dos meus dias. E obrigada, também, pela oportunidade, ensinamentos e pela confiança, serei eternamente grata. “Te amo Dra.”

Aos professores Nelcio Antônio Tonizza de Carvalho e Julia Greyci Soares que foram os anjos que Deus colocou no meu caminho e na minha vida. Sem vocês nada disso estaria acontecendo e o projeto não seria executando com tanta excelência. Não tenho palavras para agradecer tudo que fizeram por mim, só Deus para retribuir vocês. Minha gratidão será eterna!

À Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Registro – São Paulo (SP) (Polo Regional do Vale do Ribeira – Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios), localizada no Estado de São Paulo, Brasil, em especial ao Prof. Dr. Nelcio Antônio Tonizza de Carvalho, por acreditar neste projeto, e disponibilizar a estrutura, os animais e pela realização do projeto.

Ao Prof^o. Dr. José Antônio Dell’Aqua Junior, pelos ensinamentos, parceria e por sempre se prontificar a ajudar.

À empresa Botupharma Biotecnologia Animal, pela disponibilização do fármaco Firocoxib utilizado no projeto.

Ao Profº. Dr. Rogerio Giuffrida, pela amizade e carinho, e também pela grande ajuda com as análises estatísticas. “Te amo”.

Aos amigos e colegas da Pós-graduação, em especial Viviane Maria Codognoto, que me ajudou desde quando cheguei na instituição, sem você não teria conseguido. Obrigada por tudo de coração “Porta”, que Deus te abençoe sempre. Edjalma R.S. Junior e Roberto R. Rosa Filho (Beto) que me ajudaram na realização do projeto experimental, meu muito obrigada de coração, que Deus abençoe vocês sempre.

À dona Leliana Rosa, que sempre nos recebeu com tanto amor e carinho em sua casa na cidade de Registro (SP), nos dando pouso e alimentação, meu muito obrigada, você é uma mulher admirável, que Deus te abençoe sempre.

As minhas amigas Bruna Martins e Jaqueline Brandão, vocês também são anjos que Deus colocou em minha vida, não tenho palavras para agradecer vocês por tudo, gratidão é palavra que tenho para vocês.

A todos os demais docentes e funcionários do Setor de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Botucatu, SP.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), Código de Financiamento 001, pela bolsa concedida no início do mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela bolsa concedida (Processo 2019/14353-9).

À FMVZ, Unesp, Botucatu, SP, e ao Programa Pós-Graduação em Biotecnologia Animal.

E todos que de alguma forma me ajudaram. Meu muito obrigada!

“Nada é eterno neste mundo, nem mesmo nossos problemas”.

Charles Chaplin

SUMÁRIO

RESUMO.....	I
ABSTRACT.....	II
CAPÍTULO 1.....	1
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	2
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Ciclo estral de fêmeas bubalinas.....	4
2.2. Ovulação e Mediadores da Inflamação.....	5
2.3. Luteinização e Luteólise.....	8
2.4. Gestação e mortalidade embrionária.....	10
2.5. Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs).....	12
2.5.1. Flunixinina meglumina (FM).....	13
2.5.2. Firocoxib (FIRO).....	14
3. REFERÊNCIAS.....	15
4. HIPÓTESE.....	28
5. OBJETIVOS.....	28
5.1. Objetivo geral.....	28
5.2. Objetivo específico.....	28
CAPÍTULO 2.....	29
Trabalho científico.....	30
ANEXOS.....	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Protocol applied in female buffaloes for synchronization and detection of estrus. D-10: first day of estrous synchronization; D-2: nine days after the beginning of synchronization; D-1: ten days after the beginning of estrous synchronization; D0*: ovulation day; D6: six days after ovulation, day of manipulation of the reproductive tract of females and application of treatments; D12: twelve days after ovulation; D18: eighteen days after ovulation; EB: estradiol benzoate; P4: application of the progesterone pessary; PGF2 α : prostaglandin F 2 α analog; eCG - equine chorionic gonadotrophin; Ov: ovulation day; [] P4: measurement of plasma levels of progesterone concentration; ØCL: estimation of the area of the CL. 35

Figura 2. Means $\pm$ SEM (vertical lines applied to the bars) of the estimated areas for the corpus luteum in buffaloes submitted to reproductive tract manipulation, according to treatment and time after manipulation (days). 37

Figura 3. Means $\pm$ SEM (vertical lines applied to the bars) of the plasma P4 dosages in buffaloes subjected to uterine manipulation, according to treatment and time after manipulation (days). 38

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AA – Ácido araquidônico
AINEs – Anti-inflamatórios não esteroidais
Bst – Interferon Bovina
CL - Corpo lúteo
COX – 2 - Ciclo-oxigenase 2
COX – Coxidenase
COX -1 – Ciclo-oxigenase 1
DHA – Ácido docosahexaenóico
E2 – Estrógeno
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPA – Ácido eicosapentaenoico
ER - Receptor de Estrógeno
FDA- Food and drug administration
FIRO – Firocoxib
FM- Flunixinina meglumina
FNT- α - Fator de necrose tumoral alfa
FSH- Hormônio folículo estimulante
GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofina
hcg – Gonodotrofina coriônica humana
IA – Inseminação artificial
IFN – interferon
IFN - τ - Interferon – tau
IL – 6 – Interleucinas
IL- 8 – Interleucinas
IL-1 – Interleucinas
IL-1R – Interleucinas
LH – Hormônio Luteinizante
MMPS – Metaloproteinases de matriz
mRNA- Acido Ribonucleico mensageiro
OT - Ocitocina
OTR - Receptores de ocitocina
P4 - Progesterona

PBS- Meio tampão fosfato-salino

PGE – Prostaglandina E

PGF2 α – Prostaglandina

PGFM - 13,14-dihydro-15-keto-PGF2 α

PGH2 – Prostaglandina h2

pH- Potencial hidrogeniônico

PIVE – Produção In Vitro de Embrião

PLA 2 – Fosfolipase A2

rIFN – $\tilde{\text{I}}$ – Interferon-tau recombinante

SOV – Superovulação

TE - Transferência de embrião

TE-HEPES – Meio de manutenção

TETF- Transferência de embrião em tempo fixo

VIEIRA, A. F. Influência da flunixin meglumina e do firocoxib na fase lútea de fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis* Linnaeus, 1758) receptoras de embriões. Botucatu, 2021. 60p. Exame geral da qualificação da dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal para obtenção do título de Mestre. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP).

RESUMO:

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a ação da flumexin meglumina (FM) e do firocoxib (FIRO) como inibidores da síntese de prostaglandina na fase lútea por meio de avaliações das concentrações plasmáticas de progesterona (P4). Foram utilizadas 29 búfalas múltiparas híginas adultas submetidas à manipulação do trato reprodutivo após à sincronização do cio. Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos: Grupo controle (G1, n = 9), ausência de tratamento; Grupo experimental FM (G2, n = 10), aplicação única de 1,1 mg/Kg; Grupo experimental FIRO (G3, n = 10), aplicação única de 0,1 mg/Kg, ambas por via intravenosa. As características do corpo lúteo (CL) foram determinadas pelo exame ultrassonográfico, e posteriormente foram determinadas as concentrações plasmáticas de P4. Com base nas análises realizadas, foi identificado que nos grupos FM e FIRO o CL se manteve com tamanho similar ao longo do estudo, enquanto que o no Grupo Controle foi observada uma redução significativa entre o sexto dia (D6), 12º dia (D12) e 18º dia (D18) após à sincronização do cio. Com relação a concentração plasmática de P4, foi identificado um aumento significativo no D12, seguido por uma diminuição estatisticamente significativa no D18 em todos os grupos. Os grupos FM e FIRO foram capazes de manter uma concentração mais alta de P4 no D18 quando comparados ao Grupo Controle. A aplicação única de FM (1,1 mg/Kg) e FIRO (0,1 mg/Kg) foi benéfica na prevenção da queda das concentrações de P4 no período crítico para a concepção em fêmeas bubalinas.

Palavras-chave: anti-inflamatório, búfala, corpus lúteo, estro sincronização, ultrassonografia.

VIEIRA, A. F. Influence of flunixin meglumine and firocoxib in the luteal phase of bubaline females (*Bubalus bubalis* Linnaeus, 1758) embryo recipients. Botucatu, 2021. 60p. Exame geral da qualificação da dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal para obtenção do título de Mestre. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP).

ABSTRACT:

The aim of this study was to evaluate the effects of flumexin meglumine (FM) and firocoxib (FIRO) as inhibitors of prostaglandin synthesis in the luteal phase through assessments of plasmatic measures of progesterone (P4). Twenty-nine healthy adult multiparous buffaloes submitted to manipulation of the reproductive tract after estrus synchronization were used. The animals were randomly divided into three groups: Control Group (G1, n = 9), no treatment; FM Experimental Group (G2, n = 10), single application of 1.1 mg/kg; FIRO Experimental Group (G3, n = 10), single application of 0.1 mg/kg, both intravenously. The characteristics of the corpus luteum (CL) were determined by ultrasonographic examination, and were determined according to the plasma levels of P4. Based on the analyzes performed, it was identified that in the FM and FIRO groups the CL remained with a similar size throughout the study, while the Control Group showed a defined reduction between the sixth day (D6) and 12th day (D12) and 18th day (D18) after estrus synchronization. Regarding plasma P4 concentration, a significant increase in D12 was identified, followed by a statistically significant decrease in D18 in all groups. The FM and FIRO groups were able to maintain a higher concentration of P4 on D18 when compared to the Control Group. The single application of FM (1.1 mg/kg) and FIRO (0.1 mg/kg) was beneficial in preventing the fall of P4 specialties in the critical period for conception in buffalo females.

Keywords: anti-inflammatory, buffalo, estrus, corpus luteum, synchronization, ultrasound.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Entre os anos de 2005 e 2015 a taxa de produção mundial de búfalos e de seus derivados (ex. leite) foi de 14,1% e 24,5%, respectivamente (FAO, 2015). Na atualidade, é contabilizado mais de 200 milhões de cabeças de rebanho bubalino ao redor do mundo, e a produção de leite anual é acima de 97,5 milhões de toneladas (FAO, 2015). De acordo com Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística Brasileiro (IBGE), este rebanho alcançou a marca de 1.434.141 cabeças em todo o território brasileiro no ano de 2016 (IBGE, 2017), com um aumento acima de 10% quando comparado com ano anterior (FAO, 2015).

O aumento da produtividade do rebanho bubalino está associado à implementação de técnicas de melhoramento genético por meio de biotecnologias da reprodução, tendo em vista o fator socioeconômico (SOARES, 2015). Essas biotecnologias incluem a transferência embrionária (TE) e a produção *in vitro* de embriões (PIVE), advindo pelo conhecimento do ciclo estral e da dinâmica folicular desta espécie (MANN e LAMMING, 2001; PEREIRA, 2015).

Diversas pesquisas foram realizadas com o intuito de avaliar a TE em búfalas (OBA et al., 1994; CARVALHO et al., 2002; CAMPANILE et al., 2010), e foram identificadas limitações associadas à baixa taxa de recuperação embrionária (BARUSELLI et al., 2000; ZICARELLI et al., 2000; CARVALHO et al., 2002). Estudo realizado por Baruselli et al. (2000) identificaram um percentual menor (34,8%) de ovulações em búfalas submetidas à superestimulação folicular quando comparadas com fêmeas bovinas que apresentaram taxas superiores à 60% (ADAMS, 1994). Essa diferença foi associada com a falha nos batimentos ciliares do epitélio da tuba uterina e/ou na contração da musculatura lisa da miosalpinge, ambas controladas por hormônios esteroides ovarianos (CARVALHO et al., 2007).

Os tratamentos hormonais melhoraram os índices de sucesso da TE, sendo baseado na inibição da luteólise por meio de uso de progestágenos, do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) e do hormônio luteinizante (LH); ou pelo aumento na produção de interferon bovino (bST) (MANN e LAMMING, 2001).

O processo de luteólise está associada diretamente com a síntese de prostaglandinas F2 alfa (PGF2 α), e esta por sua vez com a expressão da enzima ciclo-oxigenase 2 (COX-2) (CARDOSO et al., 2020). Desse modo, utiliza-se o ácido graxo, ex. ácido linoleico, como forma de incrementar as taxas de prenhez devido à propriedade inibitória da síntese de prostaglandina endometrial via inibição da atividade da COX-2 (CARDOSO et al., 2020). Por outro lado, o ácido linoleico também age inibindo as enzimas fosfolipase A2 (PLA 2) e ciclo-oxigenase (COX) por meio da competição com o ácido araquidônico (AA) na síntese dessas enzimas indutoras da PGF2 α (CARDOSO et al., 2020). Acredita-se que a inibição da proteína regulatória aguda da esteroidogênese (StAR) responsável pela diminuição na captação e transporte de colesterol para o corpo lúteo (CL) seja um ponto a ser considerado na inibição exercida pela PGF2 α sobre a síntese de progesterona (P4) pelo CL (NISWENDER et al., 2000). Outra alternativa de inibição da luteólise seria o uso de anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), como a flunixinina meglumina (FM) ou o firocoxib (FIRO) que possuem ação inibitória na síntese da COX-2 (WASFI et al., 2015).

Visto que a liberação da PGF2 α no endométrio pode ocorrer durante a TE, e presumindo que métodos que visam a inibição de COXs possam aumentar as taxas de prenhez de receptoras de embriões em fêmeas bovinas (MANN e LAMMING, 2001), o presente trabalho tem como objetivo avaliar a ação do FM e do FIRO como inibidores da síntese de prostaglandina na fase lútea de fêmeas bubalinas receptoras de embriões, por meio de avaliações das concentrações plasmáticas de P4.

Os resultados do estudo poderão ser utilizados como alicerces para aumento da taxa de prenhez de fêmeas bubalinas submetidas à TE utilizando como base os AINEs de custo baixo e amplamente usados na área da Medicina Veterinária. Por outro lado, o uso do FIRO como método inibitório de secreção de PGF2 α em búfalas está ausente na literatura, determinando assim o ineditismo do presente trabalho.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Ciclo estral de fêmeas bubalinas

O conhecimento do ciclo estral é de extrema importância para a implementação de programas reprodutivos que envolvam a sincronização do estro e ovulação em fêmeas de produção, incluindo as búfalas (BARUSELLI et al., 1997). Nas fêmeas bubalinas a PIVE representa um mercado promissor e em ascensão, porém diversas limitações de natureza técnica que inclui a baixa produção de blastocistos têm prejudicado o uso desta biotécnica em escala comercial (PEREIRA, 2015).

A produtividade do rebanho bubalino é influenciada pelas particularidades da espécie, como a manifestação discreta do estro, puberdade tardia, anestro pós-parto prolongado, baixas taxas de concepção e sazonalidade reprodutiva (PEREIRA, 2015). Assim, a TE é utilizada com o intuito de melhorar os índices reprodutivos e produtivos nesses rebanhos (PEREIRA, 2015). Paralelamente, a maioria dessas transferências são usadas receptoras da espécie bovina com sinais de estro identificadas entre o sexto e nono dia (CARDOSO et al., 2020).

As fêmeas bubalinas possuem similaridades com o ciclo estral das fêmeas bovinas, porém com pequenas particularidades (SILVA et al., 2009). Durante o ciclo estral ocorrem duas fases ao nível do folículo dominante, a fase luteal e a fase folicular, sendo a primeira mais longa e com secreção de P4 pelo CL, e a segunda mais curta e com concentrações plasmáticas elevadas de estrógeno (E2) e baixas de P4 (JAINUDEEN e HAFEZ, 2016).

O ciclo estral das búfalas tem duração média de 23 dias, podendo variar entre 21 e 24 dias, e pode ser influenciado por fatores nutricionais e genéticos, pela idade e pelo clima, sendo que o estro ocorre com maior intensidade durante o outono e inverno, conferindo uma estacionalidade reprodutiva (FERREIRA, 2017).

Desse modo, as búfalas são classificadas como fêmeas poliéstricas estacionais de dias curtos em regiões com menores latitudes, e poliéstricas contínuas quanto maior sua proximidade a linha do Equador, determinando a duração da luminosidade como o estímulo que coordena o ciclo estral (ZICARELLI, 1997; BARUSELLI et al., 2001; SRINIVASAN et al., 2009; FERREIRA, 2017).

A sazonalidade do ciclo estral é regulada pela melatonina, um hormônio sintetizado pela glândula pineal, e secretado durante o período noturno (SENGER, 2003). Assim, quanto maior a exposição à luz solar, que ocorre em dias longos durante o verão e primavera, menor é a secreção da melatonina (SRINIVASAN et al., 2009). No entanto, nas estações de dias mais curtos como o outono e inverno ocorre o inverso, identificando uma menor exposição à luz solar com uma maior produção e secreção do hormônio (SRINIVASAN et al., 2009). Por sua vez, a melatonina estimula a secreção do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) pelo hipotálamo, e alcança a hipófise pelo sistema porta hipotalâmico-hipofisário induzindo a liberação das gonadotrofinas pela adenohipófise, e estas atuam diretamente na maturação folicular, ovulação e na formação de CL (ROCHA et al., 2011).

As condições de manejo também são importantes no ciclo estral visto que a condição nutricional da búfala gestante interfere na produção folicular fetal (SANTOS et al., 2002; MOSSA et al., 2013). Segundo Mossa et al. (2013), fêmeas bovinas submetidas a qualquer tipo de restrição alimentar possuem alto índice de parir bezerras com menor população de ovócitos e menor quantidade de folículos antrais na sua fase adulta.

2.2. Ovulação e mediadores da inflamação

Nas fêmeas bubalinas é identificada entre uma e três ondas foliculares no estro, sendo mais comum duas ondas foliculares (BARUSELLI et al., 1997; ALI et al., 2003; PRESICCE et al., 2004; EL-WISHY, 2007). Essas ondas estão associadas com a fase lútea que corresponde a $10,4 \pm 2,1$ dias em ciclos estrais de duas ondas, sendo que o intervalo entre as ovulações varia entre 21 e 25 dias, e em búfalas com três ondas observa-se um período mais longo (BARUSELLI et al., 1997).

A ovulação é um processo onde ocorre a liberação do ovócito por meio da ruptura da parede do folículo ovariano maduro, e consequentemente degradação da matriz de colágeno (GOTTSCHE et al., 2000). Esse processo envolve a maturação do ovócito, remodelação da matriz extracelular folicular e mudanças morfológicas e bioquímicas das células da granulosa e da teca do folículo ovulatório que posteriormente se transformam em células do CL (GOLDMAN e SHALEV, 2004; DUFFY et al., 2019). Segundo Nathan (2002), a ovulação é considerada um processo inflamatório agudo visto que ocorre envolvimento e reconhecimento do agente causador do estímulo agressivo e posterior reestabelecimento do tecido comprometido. Paralelamente, ocorre a amplificação do sistema imune e liberação das células e mediadores bioquímicos inflamatórios específicos da cicatrização (NATHAN, 2002; SUZUKI et al., 2003). Esses mediadores incluem as citocinas pró-inflamatórias [interleucinas 1, 6 e 8 (IL-1; IL-6; IL-8), fator de necrose tumoral alfa (FNT- α) e o interferon gama (IFN- γ)], eicosanoides [prostaglandinas E e F (PGE e PGF) derivadas do AA]; além das proteases, collagenases e das metaloproteinases de matriz (MOSQUINI et al., 2011; DENNIS e NORRIS, 2015).

As citocinas inflamatórias são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares produzidas por diferentes células localizadas no local da lesão, como também por células do sistema imunológico (LIN et al., 2000). Elas são ativadas pelas proteinoquinases, e ao contrário dos hormônios clássicos as citocinas não são armazenadas como moléculas preformadas; atuam pelos mecanismos parácrino e autócrino; e agem por pleiotropia, isto é uma única citocina pode agir e estimular diversas células (LIN et al., 2000; ZHANG e AN, 2007). Suas funções estão associadas com a atividade, diferenciação, proliferação e o tempo de vida útil da célula imunológica (CURFS et al., 1997), e, também, na regulação da produção e da ação de citocinas, aumentam (citocinas pró-inflamatórias) ou diminuem (citocinas anti-inflamatórias) a resposta inflamatória (CURFS et al., 1997). Contudo, a produção exacerbada e persistente das citocinas pró-inflamatórias após o estímulo agressor induz alterações metabólicas (CURFS et al., 1997; LIN et al., 2000; RAEBURN et al., 2002; ZHANG e AN, 2007).

A IL-1 é produzida pelos macrófagos, monócitos, fibroblastos, células endoteliais, e entre outras, e está associada as membranas celulares (RAEBURN et al., 2002; ZHANG e AN, 2007; WOLF et al., 2008). Ela induz a inflamação por meio da ativação da COX-2 e com a formação de PGE2 no hipotálamo anterior (WOLF et al., 2008). A IL-6 é secretada também pelos macrófagos e monócitos, e pelos eosinófilos, sendo o FNT- α e a IL-1 consideradas indutores da IL-6 (CURFS et al., 1997). Essa interleucina promove maturação e ativação de neutrófilos e macrófagos, e diferenciação ou manutenção de linfócitos-T citotóxicos (CURFS et al., 1997; WOLF et al., 2008). Por sua vez, a IL-8 é secretada pelos macrófagos ativados e estimula a diferenciação dos linfócitos em produtores de IFN- γ (RAEBURN et al., 2002; ZHANG e AN, 2007; WOLF et al., 2008).

O FNT- α é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente pelos monócitos, macrófagos e linfócitos-T, e participa no processo de apoptose e na proliferação de linfócitos-T, fibroblastos, e entre outras células (RAEBURN et al., 2002; ZHANG e AN, 2007). Outras funções do FNT- α incluem a estimulação e liberação de moléculas de adesão, PGE2 e eicosanoides (CURFS et al., 1997; RAEBURN et al., 2002). O IFN- γ é uma citocina solúvel dimerizada que estimula genes por meio de moléculas de sinalização e atua em diferentes células (ZHANG e AN, 2007). Ele é liberado após a indução da resposta imune adaptativa, tendo como principal função a atração de macrófagos e reorganização das áreas com presença de inflamação (RAEBURN et al., 2002; ZHANG e AN, 2007).

O interferon-tau (IFN- τ) é considerado um interferon com capacidade de atividade antiviral elevada e inibição da regressão do CL por meio supressão da liberação pulsátil de PGF2 α endometrial induzida pela presença do embrião viável (MANN e LAMMING, 2001; MARQUES et al., 2007). Consequentemente, esse embrião age de forma parácrina na fêmea bovina anulando a transcrição de genes para receptores de ocitocina e estrógeno no endométrio, e assim ocorre a ausência da liberação de PGF2 α (MARQUES et al., 2007).

Mann e Lamming (2001) identificaram em seu estudo uma correlação entre o tamanho embrião no período de reconhecimento materno e a quantidade de IFN- γ no lúmen uterino, concluindo que que conceptos menos desenvolvidos ou inviáveis estão associados com baixas concentrações de IFN- γ intrauterino e, e consequentemente com falha no bloqueio da liberação de PGF2 α pelo endométrio resultando perda embrionária.

Os eicosanoides são liberados pelos fosfolipídios da membrana celular lesada por ação catalítica da fosfolipase A2, sendo que a hidroxiperoxidase e as ciclo-oxigenase 1 (COX-1) e a COX-2 catalisam as reações de síntese dos prostanoides (prostaglandina e tromboxano) por meio do AA (MOSQUINI et al., 2011; MONTORO et al., 2012). Essas COXs participam na formação de peróxidos bicíclicos (endoperóxidos) por meio da oxigenação de ácidos graxos poli-insaturados (MARNETT et al., 1999), e são inibidas pelos AINEs e consequentemente redução da conversão do AA em prostaglandinas (BOMBARDIER et al., 2000; MOSQUINI et al., 2011).

2.3. Luteinização e luteólise

Com a formação do CL inicia-se a secreção da P4 de forma exponencial até o meio da fase lútea, onde ocorre um platô (SILVIA et al., 1991). Nesse período a P4 exerce um efeito inibitório sobre a secreção da PGF2 α ao nível dos genes da ocitocina (OT) e bloqueia a produção de E2 (JENNER et al., 1991; SILVIA et al., 1991).

O CL de búfalas é considerado menor e menos pronunciado que o das fêmeas bovinas (DROST et al., 1983). Paralelamente, a P4 induz a diminuição da secreção dos hormônios luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH) durante a fase lútea por meio de retroalimentação negativa sobre a liberação do GnRH pelo hipotálamo (NISWENDER et al., 2000; SANTOS et al., 2001; THATCHER et al., 2001), como também estimula o acúmulo de AA e COXs no endométrio (SILVIA et al., 1991). Diferentes estudos relacionaram os níveis de P4 com o desenvolvimento embrionário em fêmeas bovinas, como também a presença de concentrações elevadas de P4 entre a inseminação e a concepção e concentrações elevadas do IFN- γ (MANN e LAMMING, 2000).

A fase luteolítica é caracterizada pela secreção da $\text{PGF2}\alpha$ pelo endométrio, diminuição da vascularização, fagocitose e apoptose das células do CL, entre outros (AROSH et al., 2002; NEUVIANS et al., 2003; TANIKAWA et al., 2005) e inicia-se entre o 15º e 18º dia do ciclo estral, momento onde ocorre a ausência de fertilização do ovócito ou embrião viável (AROSH et al., 2002; TANIKAWA et al., 2005). A liberação desse hormônio também está associada à OT e E2 que possuem efeitos estimulatórios na liberação de $\text{PGF2}\alpha$ (MIYAMOTO et al., 2000).

De acordo com Diaz et al. (2002), a $\text{PGF2}\alpha$ bovina também pode ser secretada pelas células do CL e conseqüentemente a indução de uma retroalimentação positiva ao nível do endométrio, e sendo associada à ativação da enzima COX-2 nas células do CL de maiores dimensões. Niswender et al. (2000), Arosh et al. (2004) referenciaram presença de receptores específicos em membrana celular do CL de fêmeas bovinas que são responsáveis pela ativação de mensageiros secundários [trifosfato inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG)], que por sua vez estimulam o acionamento da proteína quinase C (PKC) e a liberação de cálcio intracelular. A principal hipótese do mecanismo de ação da PKC e do cálcio intracelular que agem na luteólise está associada à diminuição no fluxo sanguíneo e inibição da StAR luteal (McCRACKEN et al., 1999).

A OT induz a secreção de $\text{PGF2}\alpha$ e a regressão do CL devido à expressão dos receptores de ocitocina localizados no endométrio (ROBINSON et al., 2001; DURAS et al., 2005). Ambos os hormônios, $\text{PGF2}\alpha$ e OT, também induzem um mecanismo de retroalimentação positiva que age entre o útero e o CL, reforçando a regressão luteal (ROBINSON et al., 2001).

Por sua vez, o E2 participa na luteólise por meio de dois estímulos que incluem o estímulo hipotalâmico que aumenta a frequência de pulsos de OT; e o estímulo endometrial que eleva a concentração de receptores para OT no E2 (McCRACKEN et al., 1999). Esses receptores de E2 ($\text{ER}\alpha$ e $\text{ER}\beta$) são mais expressivos no CL, sendo que os $\text{ER}\alpha$ são identificados em elevadas concentrações na fase lútea, e os $\text{ER}\beta$ apresentam-se aumentados na fase luteolítica (SHIBAYA et al., 2007; MARTIN et al., 2010).

Ambrose et al. (1998) identificaram que as células lúteais secretam a $\text{PGF2}\alpha$, e nas fêmeas bovinas ocorre uma retroalimentação positiva entre esse hormônio e o CL. Segundo esses autores, o fenômeno foi associado à ativação da COX-2 nas células grandes do CL. Outros fatores que foram relacionados com a fase de luteólise incluem os fatores angiogênicos [fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1)], fatores vasoativos, proteína quimiotática para monócito-1 (MCP-1) que está associada ao $\text{FNT}\alpha$ e Interferon gama ($\text{IFN-}\gamma$), e entre outros (CAVICCHIO et al., 2002).

2.4. Gestação e mortalidade embrionária

Segundo Baldrighi et al. (2014) as fêmeas bubalinas apresentam baixa quantidade e qualidade de seus folículos antrais, e desse modo menor taxa de prenhez (OHASHI et al., 2017). Paralelamente, qualquer fator que induza a secreção de $\text{PGF2}\alpha$ pode induzir a luteólise e a falha na gestação (VANROOSE et al., 2000). A manipulação uterina durante a TE em fêmeas bovinas e bubalinas também pode resultar na liberação de $\text{PGF2}\alpha$ pelo endométrio visto que geralmente a avaliação do CL é realizada por manipulação transretal do colo do útero, e em poucas situações com o auxílio do exame ultrassonográfico (SCENNA et al., 2005). Para que ocorra a gestação é necessário que haja a presença embrião viável no corno uterino ipsolateral ao ovário que apresenta um CL funcional antes do reconhecimento materno da gestação (ROBERT et al., 1992).

Existem diversas estratégias para diminuir a taxa de mortalidade embrionária precoce em fêmeas receptoras de embriões por meio do entendimento dos fatores que afetam negativamente o desenvolvimento embrionário (THATCHER et al., 2001). Essas estratégias podem incluir o aumento do número e taxa de crescimento do CL e do tamanho do folículo pré-ovulatório gerando um CL maior e consequentemente maior produção de P4 (VASCONCELOS et al., 2001).

A indução do crescimento de folículo pré-ovulatório sob baixas concentrações de P4 e similares promove a obtenção de folículo maiores e persistência do folículo dominante (MOURA et al., 2001). Esse folículo dominante induz baixas taxas de concepção após a inseminação artificial (IA), estando relacionado com mudanças no ambiente do corno uterino ou com à ativação prematura do ovócito (AMBROSE et al., 1998). Segundo esses autores, a duração e a amplitude do pico ovulatório de LH está associada com a taxa de crescimento e a diferenciação do CL, sendo que a indução da LH por meio de aplicações de GnRH em protocolos Ovsynch, são de menor duração do que picos não induzidos. Os mesmos autores identificaram maior taxa de crescimento do CL e concentrações plasmáticas elevadas de P4 em fêmeas bovinas submetidas ao implante de deslorelina quando comparadas ao grupo controle, e assim concluiu-se que a liberação prolongada de GnRH associada ao implante resultou em um pico maior e prolongado de LH.

A presença de CLs acessórios identificados durante a primeira onda do ciclo estral devido ao uso de fármacos que induzem o aumento da P4 plasmática [GnRH, LH, gonadotrofina coriônica humana (hCG)] pode ser considerada como outra estratégia para o sucesso para diminuir o índice de mortalidade embrionária precoce (SANTOS et al., 2001; HOWARD et al., 2006; STEVENSON et al., 2007). Machado (2006) demonstrou em seu estudo o aumento da concentração plasmática de P4 e o atraso da luteólise após administração da GnRH no início da fase lútea e do hCG no final da mesma fase em vacas da raça Red Angus.

O estímulo anti-luteolítico exercido pelo embrião e a diminuição da resposta luteolítica pela fêmea gestante exerce um papel importante na gestação (THATCHER e HANSEN (1992). Segundo os autores, conceptos menores não sintetizam IFN- γ suficiente para evitar a luteólise, e desse modo a gestação é interrompida visto que o embrião cessa o envio dos sinais anti-luteolíticos para o endométrio materno. Meyer et al. (1995) preveniu perdas embrionárias em vacas holandesas por meio de administração de IFN- γ recombinante (rIFN- γ) duas vezes ao dia no período compreendido entre o 14º e 24º dia do ciclo estral, e assim aumento do tempo de vida do CL.

A inibição da síntese de enzimas envolvidas na produção de prostaglandinas também tem demonstrado resultados promissores no aumento das taxas de prenhez de receptoras embrionárias bovinas (AROSH et al., 2002). Os fatores limitantes na secreção de PGF2 α incluem a biodisponibilidade do AA e das COX-1 e COX-2 (THATCHER et al., 1997). Por outro lado, os ácidos graxos poli-insaturados como o ácido linoleico, o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA) inibem a síntese de prostaglandina por meio do bloqueio da atividade da COX-2 (THATCHER et al., 1992; MATTOS et al., 2002; COYNE et al., 2008). A administração de AINES seletivos para COX-2 podem atenuar a secreção das prostaglandinas visto que reduzem a conversão do AA em prostaglandinas (BOMBARDIER et al., 2000; MOSQUINI et al., 2011).

2.5. Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs)

Os AINEs são amplamente utilizados na rotina veterinária para minimizar as respostas inflamatórias que induzam a síntese das prostaglandinas, tromboxanos e COX (MOSQUINI et al., 2011). A COX-1 atua na manutenção das concentrações basais das prostaglandinas nos tecidos, contudo a COX-2 está associada à inflamação e ausente na maioria das células (CHANDRASEKHARAN et al., 2002). Apesar de existirem semelhanças nas sequências de aminoácidos que compõe as COXs existem algumas particularidades como a presença da leucina na COX-1, e sua ausência na COX-2, sendo substituída pela valina, de menor peso molecular (MARNETT et al., 1999).

Estudo realizado por Simmons et al. (1999) identificou a ciclo-oxigenase 3 (COX-3) em tecidos de cães, porém o mecanismo de ação da sua inibição no sistema nervoso associado a administração de AINEs é escasso na literatura (CHANDRASEKHARAN et al., 2002). Ao contrário das outras COXs, a COX-3 não induz a produção de prostaglandinas pró-inflamatórias, mas sim um produto pertencente à família das ciclopentanonas (CARVALHO et al., 2004).

Odensvik et al. (1998) relataram o atraso da luteólise e do estro após administração de AINEs em novilhas, correlacionando o seu uso com a inibição da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ no endométrio e manutenção CL. A administração de AINEs no momento da TE pode influenciar positivamente na taxa de prenhez de fêmeas bovinas visto que a $\text{PGF}_{2\alpha}$ liberada pelo endométrio pode interferir no aumento da mortalidade embrionária precoce (HOCKETT et al., 2004; SCENNA et al., 2005). Estudos citaram o benefício do uso dos AINEs sobre a taxa de prenhez em receptoras de embriões bovinos, pela inibição da secreção da $\text{PGF}_{2\alpha}$ mesmo com uma variabilidade elevada nas taxas de prenhez (ELLI et al., 2001).

2.5.1. Flunixinina meglumina (FM)

O FM é um fármaco pertencente ao grupo dos AINEs que atuam na circulação periférica e possuem ação anti-inflamatória, analgésica, antitrombótica e antiendotóxicas, antipirética e analgésica, sendo essas propriedades associadas à atividade inibitória gerada por substâncias que metabolizam o AA, COX e a lipoxigenase (OKADA, 2017). A sua biodisponibilidade varia entre 60% em bovinos e 86% e equinos (OKADA, 2017).

Pugliesi et al. (2012), realizaram um tratamento com o FM (2,5 mg/kg) a cada oito horas no 16º dia do ciclo estral em fêmeas bovinas, e identificaram redução dos pulsos de $\text{PGF}_{2\alpha}$ antes e durante a luteólise e atraso do início da redução da P4. Por sua vez, Odensvik et al. (1998), Aké-López et al. (2005) relataram o atraso da luteólise e consequentemente aumento no intervalo interestral após o uso do FM. O ciclo estral prolongado induz a um desenvolvimento embrionário maior, aumento da secreção de $\text{IFN-}\gamma$ e consequentemente reconhecimento da gravidez pela fêmea bovina (AKÉ-LÓPEZ et al., 2005).

Odensvik et al. (1998) avaliaram o efeito da FM na dose de 2,2 mg/kg na duração do ciclo estral e na manutenção do CL em novilhas. As fêmeas receberam o FM em frequências de administração diferentes: a cada 12 horas, oito e seis horas; durante nove dias, e iniciando no 14º ou 15º dia do ciclo estral. Os autores identificaram um aumento da duração média do ciclo estral nas novilhas que receberam FM a cada oito e seis horas e além disso não ocorreu a luteólise até o término do tratamento. Estudo realizado por Scenna et al. (2005) demonstrou taxas de prenhez significativamente maiores em vacas submetidas ao tratamento com 500 mg de FM quando comparadas ao grupo controle.

2.5.2. Firocoxib (FIRO)

O FIRO é um AINEs inibidor da ciclo-oxigenase e altamente seletivo para a COX-2, e com efeitos mínimos sobre o COX-1, reduzindo assim as possíveis intercorrências associadas a inibição da via fisiológica (KVATERNICK et al., 2007). A valina incorporada à COX-2 gera uma falha na cadeia de proteínas da enzima promovendo um sítio de ligação mais acessível para a molécula do FIRO, sendo uma característica de maior especificidade do fármaco pela COX-2 (MARNETT et al., 1999). O fármaco é associado à propriedade lipofílica e alcança a biodisponibilidade absoluta no plasma após 3,9 horas, apresentando uma meia-vida de 30 horas (KVATERNICK et al., 2007).

Em equinos, o FIRO possui propriedades anti-inflamatórias e analgésicas na dose de 0,1 mg/kg a cada 24 horas (COOK et al., 2009), e a sua vida longa vida demonstrou ser vantajosa para uso prolongado (FDA, 2005). Contudo, não existe citação na literatura do uso do FIRO como método inibitório de secreção de PGF2 α em búfalas.

3. REFERÊNCIAS

ADAMS, G. P. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications for synchronization and superstimulation. **Theriogenology**, v. 41, p. 19-24, 1994.

AKÉ-LÓPEZ, R.; SEGURA-CORREA, J. C.; QUINTAL-FRANCO, J. Effect of flunixin meglumine on the corpus luteum and possible prevention of embryonic loss in Pelibuey ewes. **Small Ruminant Research**, v. 59, n. 1, p. 83–87, 2005.

ALI, A.; ABDEL-RAZEK, A. K.; ABDEL-GHAFFAR, S.; GLATZEL, P. S. Ovarian Follicular Dynamics in Buffalo Cows (*Bubalus bubalis*). **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, n. 3, p. 214-218, 2003.

AMBROSE, J.D.; PIRES, M.F.A.; MOREIRA, F.; DIAZ, T.; BINELLI, M., THATCHER, W.W. Influence of deslorelin (GnRH-agonist) implant on plasma progesterone, first wave dominant follicle and pregnancy in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 50, n. 7, p. 1157–1170, 1998.

AROSH, J. A.; PARENT, J.; CHAPDELAINE, P.; SIROIS, J.; FORTIER, M.A. Expression of cyclooxygenases 1 and 2 and prostaglandin E synthase in bovine endometrial tissue during the estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 1, p. 161–169, 2002.

AROSH, J. A.; BANU, S. K.; CHAPDELAINE, P.; MADORE, E.; SIROIS, J.; FORTIER, M. A. Prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling in corpus luteum: A basis for autoregulation of luteal function. **Endocrinology**, v. 145, p. 2551-2560, 2004.

BALDRIGHI, J. M. F.; SÁ FILHO, E. O. S.; BATISTA, R. N. V. R.; LOPES, J. A.; VISINTIN, P. S.; BARUSELLI, M. E. O. A Assumpção. Anti-Mullerian hormone concentration and antral ovarian follicle population in Murrah heifers compared to Holstein and Gyr kept under the same management. **Reproduction in domestic animals**, v. 49, n. 6, p. 1015–1020, 2014.

BARKAWI, A.H. SÁ FILHO, M.F.; BATISTA, E.O.S.; LOPES, R.N.V.R.; VISINTIN, J.A.; BARUSELLI, P.S. Characteristics of ovarian follicular dynamics throughout the estrous cycle of Egyptian buffaloes. **Animal Reproduction Science**, v. 110, n. 3–4, p. 326–334, 2009.

BARUSELLI, P.S.; MUCCIOLO, R.G.; VISINTIN, J.A.; VIANA, W.G.; ARRUDA, R.P.; MADUREIRA, E.H.; MOLERO-FILHO, J.R. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 47, n. 8, p. 1531–1547, 1997.

BARUSELLI, P. S.; MADUREIRA, E. H.; VISINTIN, J. A.; PORTO FILHO, R. M.; CARVALHO, N. A. T.; CAMPANILE, G.; ZICARELLI, L. Failure oocyte entry into oviduct in superovulated buffalo. **Theriogenology**, v. 53, p. 1. **Annual Conference of the International Embryo Transfer Society**, 2000.

BARUSELLI, P. S.; BERNARDES, O.; BARUFI, F. B.; BRAGA, D.; ARAUJO, D.; TONHATI, H. Calving distribution throughout the year in buffalo raised all over Brazil. **Proceedings of World Buffalo Congress**, p. 234-240, 2001.

BOMBARDIER, C.; LAINE, L.; REICIN, A.; SHAPIRO, D.; BURGOS-VARGAS, R.; DAVIS, B.; SCHNITZER, T.J. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. **New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 21, p. 1520–1528, 2000.

CAMPANILE, G.; BARUSELLI, P. S.; NEGLIA, G.; VECCHIO, D.; GASPARRINI, B.; GIMENES, L. U.; ZICARELLI, L.; OCCHIO, M. J. Ovarian function in the buffalo and implications for embryo development and assisted reproduction. **Animal Reproduction Science**, v. 121, n. 1–2, p. 1-11, 2010.

CARDOSO, R. C.; CODOGNOTO, V. M.; LAINETTI, P. F.; YAMADA, P. H.; RIZZOTO, G.; SALGADO, L. C.; ARAÚJO, M.S.; VIEIRA, A.F.; MARQUES, N.F.S.; OBA, E. Pregnancy rates and luteal phase characteristics of bovine embryo recipients treated with flunixin meglumine. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72 n.4, 1085-1092, 2020.

CARVALHO, N. A. T.; BARUSELLI, P. S.; ZICARELLI, L.; MADUREIRA, E. H.; VISINTIN, J. A.; D'OCCHIO, M. J. Control of ovulation with a GnRH agonist after superstimulation of follicular growth in buffalo: fertilization and embryo recovery. **Theriogenology**, v. 58, n. 9, p. 1641-1650, 2002.

CARVALHO, W. A.; CARVALHO, R. D. S.; RIOS-SANTOS, F. Analgésicos inibidores específicos da ciclooxigenase-2: avanços terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 54, n. 3, p. 448–464, 2004.

CARVALHO, N. A. T.; NAGASAKU, E. M.; VANNUCCI, F. S.; TOLEDO, L. M.; CARVALHO, J. B. P.; CARVALHO, M. I. A. B.; GIMENES, L. U.; AYRES, H.; MARTINZ, C. C.; BARUSELLI, P. S. Use of different doses of r-bST associated to a protocol for multiple ovulation and embryo transfer in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, p. 652-654, 2007.

CAVICCHIO, V. A.; PRU, J. K.; DAVIS, J. C.; RUEDA, B. R.; TOWNSON, D. H. Secretion of monocyte chemoattractant protein-1 by endothelial cells of the bovine corpus luteum: regulation by cytokines but not prostaglandin F2 α . **Endocrinology**, v.143, p.3582-3589, 2002.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, K. L. T.; EVANSON, N. K.; TOMSIK, J.; ELTON, T. S.; SIMMONS, D. L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 21, p. 13926–13931, 2002.

COYNE, G. S.; KENNY, D. A.; CHILDS, S.; SREENAN, J. M.; WATERS, S. M. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids alter the expression of genes involved in prostaglandin biosynthesis in the bovine uterus. **Theriogenology**, v. 70, p. 772-782, 2008.

COOK, V. L. COLLEEN, T.; MEYERNIGEL, B.; CAMPBELL, A.; BLIKSLAGER, A. Effect of firocoxib or flunixin meglumine on recovery of ischemic-injured equine jejunum. **American Journal of Veterinary Research**, v. 70, n.8, p. 992–1000, 2009.

CURFS, J .H.; MEIS, J. F.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J. A. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. **Clinical Microbiology Review**, v. 10, p. 742-780, 1997.

DENNIS, E. A.; NORRIS, P. C. Eicosanoid storm in infection and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n.8, p. 511–523, 2015.

DIAZ, F. J.; ANDERSON, L. E., WU, Y. L.; RABOT, A.; TSAI, S. J.; WILTBANK, M. C. Regulation of progesterone and prostaglandin F2 α production in the CL. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 191, p. 65-80, 2002.

DROST, M.; WRIGHT Jr., J. M.; CRIPE, W. S.; RICHTER, A. R. Embryo transfer in water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 20, n.5, p. 579–584, 1983.

DUFFY, D. M.; KO, C.; JO, M.; BRANNSTROM, M.; CURRY Jr, T. E. Ovulation: Parallels with inflammatory processes. **Endocrine Reviews**, v. 40, n. 2, p. 369–416, 2019.

DURAS, M.; MLYNARCZUK, J.; KOTWICA, J. Non-genomic effect of steroids on ocitocin-stimulated intracellular mobilization of calcium and on prostaglandin F2 and E2 secretion from bovine endometrium cells. **Prostaglandins and other Lipidis Mediators**, v. 76, p. 105-116, 2005.

EL-WISHY, A. B. The postpartum buffalo: II. Acyclicity and anestrus. **Animal Reproduction Science**, v. 97, n. 3–4, p. 216-236, 2007.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS. **Agriculture data**, 2015. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 01 mai. 2021.

FDA. (Food and Drug Administration). **Cyclooxygenase enzymes: regulation and function**. *Current Pharmaceutical Design*, v. 10, p. 577–588, 2005.

FERREIRA BRITO, M. Aspectos reprodutivos e biotecnologias aplicadas à espécie bubalina. **Sinapse Múltipla**, v. 6, n. 1, p. 60–65, 2017.

GOLDMAN, S.; SHALEV, E. MMPS and TIMPS in ovarian physiology and pathophysiology. **Frontier Bioscience**, v.9, n. 1, p. 2474–2483, 2004.

GOTTSCH, M. L.; VAN KIRK, E. A.; MURDOCH, W. J. Tumour necrosis factor alpha up-regulates matrix metalloproteinase-2 activity in periovulatory ovine follicles: metamorphic and endocrine implications. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 12, n. 2, p. 75, 2000.

HOCKETT, M. .; ROHRBACH, N. ; SCHRICK, F. Alterations in embryo development in progestogen-supplemented cows administered prostaglandin F2 α . **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 73, n. 3–4, p. 227–236, 2004.

HOWARD, J.M.; MANZO, R.; DALTON, J.C.; FRAGO, F.; AHMADZADEH, A. Conception rates and serum progesterone concentration in dairy cattle administered gonadotropin releasing hormone 5 days after artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 95, n. 3–4, p. 224–233, 2006.

IBGE. **Produção da Pecuária Nacional 2017**. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2017_v45_br_informativo.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2019.

JAINUDEEN, M.; HAFEZ, E. S. E. Cattle and Buffalo. In: **Reproduction in Farm Animals**. Baltimore, Maryland, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2016. p. 55–67.

JENNER, L. J.; PARKINSON, T. J.; LAMMING, G. E. Uterine oxytocin receptors in cyclic and pregnant cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 91, n. 1, p. 49–58, 1991.

KVATERNICK, V.; POLLMEIER, M.; FISCHER, J., HANSON, P. D. Pharmacokinetics, and metabolism of orally administered firocoxib, a novel second generation coxib, in horses. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 30, n. 3, p. 208–217, 2007.

LIN, E.; CALVANO, S. E.; LOWRY, S. F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, v. 127, p. 117-126, 2000.

MACHADO, R.; BARBOSA, R.; SILVA, J.; BERGAMASCHI, M.; BERTAN, C.; SARTI, L.; BINELLI, M. A redução da mortalidade embrionária-estratégia hormonal para otimizar a função luteínica em bovinos. **Embrapa Pecuária Sudeste-Circular Técnica** (INFOTECA-E), 2006.

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, n. 1, p. 175–180, 2001.

MARNETT, L. J.; ROWLINSON, S. W.; GOODWIN, D. C.; KALGUTKAR, A. S.; LANZO, C. A. Arachidonic Acid Oxygenation by COX-1 and COX-2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 33, p. 22903–22906, 1999.

MARQUES, V. B.; BERTAN, C. M.; ALMEIDA, A. B.; MEIRELLES, F. V.; PAPA, P. C.; BINELLI, M. Interferon-tau e o reconhecimento da gestação em bovinos. **Ciência Rural**, n. 1980, p. 479–488, 2007.

MARTIN, I.; RODRIGUES, M. M. P.; FUJIHARA, C. J.; MARQUES FILHO, W. C.; OBA, E.; LAUFER-AMORIM, R.; FERREIRA, J. C. P. Steroids and LH receptors and aromatase cytochrome P450 immunolocalization in Nelore (*Bos taurus indicus*) cows corpus luteum throughout the estrous cycle. **Proceedings of the XXVI World Buiatrics Congress**, Santiago, 2010.

MATTOS, R. STAPLES, C. R.; WILLIAMS, J.; AMOROCHO, A.; MCGUIRE, M. A.; THATCHER, W. W. Uterine, ovarian, and production responses of lactating dairy cows to increasing dietary concentrations of menhaden fish meal. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n.4, p. 755–764, 2002.

McCRACKEN, J. A.; CUSTER, E. E.; LAMSA, J. C. Luteolysis: A Neuroendocrine-Mediated Event. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 2, p. 263–323, 1999.

MEYER, M. D.; HANSEN, P. J.; THATCHER, W. W.; DROST, M.; BADINGA, L.; ROBERTS, R. M.; BAZER, F. W. Extension of Corpus Luteum Lifespan and Reduction of Uterine Secretion of Prostaglandin F₂ α of Cows in Response to Recombinant Interferon- τ . **Journal of Dairy Science**, v. 78, n. 9, p. 1921–1931, 1995.

MIYAMOTO, A.; SHARZYNSHI, D. J.; OKUDA, K. Is tumor necrose factor α a trigger for the initiation of endometrial prostaglandin F₂ α release at luteolysis in cattle. **Biology and Reproduction**, v.62, p.1109-1115, 2000.

MONTORO, C.; IPHARRAGUERRE, I. R.; BACH, A. Blocking opioid receptors alters short-term feed intake and oro-sensorial preferences in weaned calves. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 5, p. 2531–2539, 2012.

MOSQUINI, A. F.; ZAPPA, V.; MONTANHA, F. P. Características farmacológicas dos anti-inflamatórios não esteroidais - Revisão de Literatura. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, v. 17, p. 1–7, 2011.

MOSSA, F.; CARTER, F.; WALSH, S. W.; KENNY, D. A.; SMITH, G. W.; IRELAND, J. L.; EVANS, A. C. Maternal Undernutrition in Cows Impairs Ovarian and Cardiovascular Systems in Their Offspring¹. **Biology of Reproduction**, v. 88, n.4, p. 1–9, 2013.

MOURA, M.; MARQUES, M. O.; FRARE, J.; MADUREIRA, E. H.; BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S. Sincronização com Crestar e CIDR para inovulação de embriões bovinos em tempo fixo. **Anais do IV Simpósio Internacional de Reprodução Animal**. 2001

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 846–852, dez. 2002.

NEUVIANS, T. P.; PFAFFL, M. W.; BERISHA, B.; SCHAMS, D. The mRNA expression of the members of the IGF-system in bovine corpus luteum during induced luteolysis. **Domestical Animal Endocrinology**, v. 25, p. 359-372, 2003.

NISWENDER, G. D. JUENGEL, J. L.; SILVA, P. J.; ROLLYSON, M. K.; MCINTUSH, E. W. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 1, p. 1–29, 2000.

OBA, E.; COELHO, K. M.; VIEIRA, R. J.; PINTO, N. F.; CHACUR, M. G. M.; FERREIRA, J. C. P.; KANAGAWA, H. Estudo preliminar de superovulação e colheita de embriões em búfalas. **Zootecnia**, v. 32, p. 23, 1994.

ODENSVIK, K.; GUSTAFSSON, H.; KINDAHL, H. The effect on luteolysis by intensive oral administration of flunixin granules in heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 50, n. 1–2, p. 35–44, 1998.

OHASHI, O. M.; NOGUEIRA, N.; CORDEIRO FILHO, S.; RIBEIRO, L.; GUIMARÃES, T. V. Produção in vitro de embrião (PIVE) na espécie bubalina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, n. 1, p. 195–200, 2017.

OKADA, C. C. T. Effect of NSAIDs on fertility, early pregnancy loss and embryo mobility in recipient mares. **Dissertação (Mestrado)**, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 98f, 2017.

PEREIRA, E. C. M. Produção de oócitos e embriões bubalinos: efeitos da época do ano e da adição de óleo essencial de *Lippia origanoides* na maturação *in vitro*. **Tese (Doutorado)**. Universidade Estadual Paulista, 141f, 2015.

PRESICCE, G. A.; SENATORE, E. M.; BELLA, A.; DE SANTIS, G.; BARILE, V. L.; DE MAURO, G. J.; TERZANO, G. M.; STECCO, R.; PARMEGGIANI, A. Ovarian follicular dynamics and hormonal profiles in heifer and mixed-parity Mediterranean Italian buffaloes (*Bubalus bubalis*) following an estrus synchronization protocol. **Theriogenology**, v. 61, n. 7–8, p. 1343-1355, 2004.

PUGLIESI, G.; KHAN, F. A.; HANNAN, M. A.; BEG, M. A.; CARVALHO, G. R.; GINTHER, O.J. Inhibition of prostaglandin biosynthesis during postluteolysis and effects on CL regression, prolactin, and ovulation in heifers. **Theriogenology**, v. 78, n.2, p. 443–454, 2012.

RAEBURN, C. D.; SHEPPARD, F.; BARSNESS, K. A. Cytokines for surgeons. **American Journal of Surgery**, v. 183, p. 268-273, 2002.

ROBERTS, R.M.; LEAMAN, D.W.; CROSS, J.C. Role of interferons in maternal recognition of pregnancy in ruminants. **Proceedings Soc Exp Biol Med**, v. 200, p. 7-18, 1992.

ROBINSON, R. S.; MANN, G. E.; LAMMING, G. E.; WATHER, D. C. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptor in uterine biopsy samples throughout the oestrus cycle and early pregnancy in cow. **Reproduction**, v.122, p. 965-979, 2001.

ROCHA, R. M. P.; MATOS, M. H. T.; LIMA, L. F.; SARAIVA, M. V. A.; ALVES, A. M. C. V.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Melatonina e reprodução animal: Implicações na fisiologia ovariana. **Acta Veterinária Brasília**, v. 5, n. 2, p. 147–157, 2011.

SANTOS, J. E. P.; THATCHER, W. W.; POOL, L.; OVERTON, M. W. Effect of human chorionic gonadotropin on luteal function and reproductive performance of high-producing lactating Holstein dairy cows. **Journal of Animal Science**, v. 79, n. 11, p. 2881–2894, 2001.

SANTOS, S. D. S. D.; DANTAS, J. K.; MIRANDA, M. D. S.; BIONDI, F. C.; OHASHI, O. M. Cinética da maturação nuclear in vitro de oócitos bubalinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n. 5, p. 266–270, 2002.

SCENNA, F. N.; HOCKETT, M. E.; TOWNS, T. M.; SAXTON, A. M.; ROHRBACH, N. R.; WEHRMAN, M. E.; SCHRICK, F. N. Influence of a prostaglandin synthesis inhibitor administered at embryo transfer on pregnancy rates of recipient cows. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 78, n. 1–4, p. 38–45, 2005.

SENGER, P. Regulation of reproduction. In: **Pathways to pragnancy and parurition**. 2. ed. Washington: [s.n.]. p. 102–127.

SHIBAYA, M.; MATSUDA, A.; HOJO, T.; ACOSTA, T. J.; OKUDA, K. Expression of estrogen receptor in the bovine corpus luteum: Cyclic changes and effects of prostaglandins F₂ α and Cytokines. **Journal of Reproduction Device**, v.53, p.1059-1068, 2007.

SILVIA, W. J.; LEWIS, G. S.; MCCracken, J .A.; THATCHER, W. W.; WILSON Jr., L. Review: Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F (2 α) during luteolysis in ruminants. **Biology of Reproduction**, v. 45, n.5, p. 655–663, 1991.

SIMMONS, D. L., BOTTING, R. M., ROBERTSON, P. M. MADSEN, M. L., VANE, J. R. Induction of an acetaminophen-sensitive cyclooxygenase with reduced sensitivity to nonsteroid anti-inflammatory drugs. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96 n.6, p. 3275-3280, 1999.

SOARES, J. G. Estratégias para aumentar a recuperação de estruturas embrionárias de búfalas superovuladas. **Tese Doutorado**. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 116f. 2015.

SRINIVASAN, V.; SPENCE, W. D.; PANDI-PERUMAL, S. R.; ZAKHARIA, R.; BHATNAGAR, K. P.; BRZEZINSKI, A. Melatonin and human reproduction: Shedding light on the darkness hormone. **Gynecological Endocrinology**, v. 25, n. 12, p. 779–785, 2009.

STEVENSON, J. S.; PORTALUPPI, M. A.; TENHOUSE, D. E.; LLOYD, A.; EBORN, D. R.; KACUBA, S.; DEJARNETTE, J. M. Interventions after artificial insemination: Conception rates, pregnancy survival, and ovarian responses to gonadotropin-releasing hormone, human chorionic gonadotropin, and progesterone. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 1, p. 331–340, 2007.

SUZUKI, Y.; RUIZ-ORTEGA, M.; LORENZO, O.; RUPEREZ, M.; ESTEBAN, V.; EGIDO, J. Inflammation and angiotensin II. International **Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 35, n. 6, p. 881–900, 2003.

TANIKAWA, M.; ACOSTA, T. J.; FUKUI, T.; MURAKAMI, S.; KORZEKWA, A.; SHARZYNSHI, D. J.; PIOTROWSKA, K. K.; PARCK, C. K.; OKUDA, K. Regulation of prostaglandin synthesis by interleukin - 1 α in bovine endometrium during estrous cycle. **Prostaglandins and Other Lipid**, v.78, p.279-290, 2005.

THATCHER, W.; HANSEN, P. Systems to alter embryo survival. In **Large dairy herd management American Dairy Sciences Association**, 1992.

THATCHER, W. W., BINELLI, M., BURKE, J., STAPLES, C. R., AMBROSE, J. D., COELHO, S. Antiluteolytic signals between the conceptus and endometrium. **Theriogenology**, v.47 n.1, 131-140, 1997.

THATCHER, W. W.; GUZELOGLU, A.; MATTOS, R.; BINELLI, M.; HANSEN, T. R.; PRU, J. K. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. **Theriogenology**, v. 56, n. 9, p. 1435–1450, 2001.

VANROOSE, G.; DE KRUIF, A.; VAN SOOM, A. Embryonic mortality and embryo-pathogen interactions. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 131–143, 2000.

VASCONCELOS, J. L. M.; SARTORI, R.; OLIVEIRA, H. N.; GUENTHER, J. G.; WILTBANK, M. C. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. **Theriogenology**, v. 56, n. 2, p. 307–314, 2001.

WASFI, I. A.; SAEED, H. M.; AGHA, B. A.; KAMEL, A. M.; AL BIRIKI, N. A.; AL NEAIMI, K. M.; SULTAN, S. M. Pharmacokinetics and metabolism study of firocoxib in camels after intravenous administration by using high-resolution bench-top orbital mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v. 974, p. 17–23, 2015.

WOLF, G.; LIVSHITS, D.; BEILIN, B. Interleukin-1 signaling is required for induction and maintenance of postoperative incisional pain: genetic and pharmacological studies in mice. **Brain Behavior Immunology**, v. 22, p. 1072-1077, 2008.

ZHANG, J. M.; AN, J. Cytokines, inflammation, and pain. **International Anesthesiology Clinical**, v. 45, p. 27-37, 2007.

ZICARELLI, L. Superovulatory response in buffalo bred in Italy. **Bubalus bubalis**, v. 4, p. 167-188, 1997.

ZICARELLI, L.; P. S., B.; CAMPANILE, G.; DI PAOLO, R.; GASPARRINI, B.; NEGLIA, G.; D'OCCHIO, M. J. Embryo recovery in buffalo with timed ovulation and insemination subsequent to follicle superstimulation. **International Congress of Animal Reproduction**, 2000.

4. HIPÓTESE

A hipótese do estudo é que a aplicação da FM e do FIRO no sexto dia do ciclo estral poderá alterar a duração da fase lútea em fêmeas bubalinas.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito de única aplicação de FM e FIRO sobre a fase lútea de fêmeas bubalinas receptoras de embriões.

5.2 Objetivo específico

Avaliar em fêmeas bubalinas, o efeito de aplicação única de FM e FIRO no momento da manipulação do trato reprodutivo, no comprimento da fase lútea por meio da avaliação das concentrações plasmáticas de P4.

CAPÍTULO 2

TRABALHO CIENTÍFICO

Artigo científico a ser enviado para *Reproduction in Domestic Animals*.

Normas: <https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/14390531/homepage/forauthors.htm>

ARTIGO CIENTIFICO

Flunixin meglumine and firocoxib on the support of luteal phase in buffaloes (*Bubalus bubalis linnaeus*)

Running-title: Flunixin meglumine and firocoxib in female buffaloes

Vieira AF^a, Carvalho N^b, Soares J^b, Rizzoto G^a, Codognoto VM^a, Rosa Filho R^a, Silvar Junior E^a, Dell'Aqua J^a, Carvalho JC^a, Giufridda R^c, Monteiro LC^a, Camillo BL^a, Oba E^a.

^aDepartment of Animal Surgery and Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil

^b Agribusiness and Technology Agency (APTA)/ Regional Section Vale do Ribeira, Registro, SP, Brazil.

^c Department of Preventive Medicine, Graduate program in Animal Science – São Paulo
We Flunixin meglumine and firocoxib on the support of luteal phase in buffaloes (*Bubalus bubalis linnaeus*)

***Corresponding author:**

Eunice Oba

Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University (UNESP), Rua Prof. Dr Walter Maurício Correa, s/n, Botucatu, SP 18618–681, Brazil

Tel: +55 14 38802127; Email: eunice.oba@unesp.br.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effects of flumexin meglumine (FM) and firocoxib (FIRO) as inhibitors of prostaglandin synthesis in the luteal phase through assessments of plasmatic measures of progesterone (P4). Twenty-nine healthy adult multiparous buffaloes submitted to manipulation of the reproductive tract after estrus synchronization were used. The animals were randomly divided into three groups: Control Group (G1, n = 9), no treatment; FM Experimental Group (G2, n = 10), single application of 1.1 mg/kg; FIRO Experimental Group (G3, n = 10), single application of 0.1 mg/kg, both intravenously. The characteristics of the corpus luteum (CL) were determined by ultrasonographic examination, and were determined according to the plasma levels of P4. Based on the analyzes performed, it was identified that in the FM and FIRO groups the CL remained with a similar size throughout the study, while the Control Group showed a defined reduction between the sixth day (D6) and 12th day (D12) and 18th day (D18) after estrus synchronization. Regarding plasma P4 concentration, a significant increase in D12 was identified, followed by a statistically significant decrease in D18 in all groups. The FM and FIRO groups were able to maintain a higher concentration of P4 on D18 when compared to the Control Group. The single application of FM (1.1 mg/kg) and FIRO (0.1 mg/kg) was beneficial in preventing the fall of P4 specialties in the critical period for conception in buffalo females.

Keywords: buffalo, anti-inflammatory, estrus, corpus luteum, synchronization, ultrasound.

1. Introduction

Reproductive biotechnologies are used as a rapid basis for genetic improvement and increased pregnancy rates in production animals, e.g. are embryo transfer (ET) and in vitro embryo production (IVP) (Mann & Lamming, 2001; Pereira, 2015; Soares, 2015). Several studies have been conducted to evaluate ET in buffaloes (Oba, 2003; Carvalho, 2002; Campanile, 2010), and limitations associated with low embryo recovery rate (low quantity and quality of their antral follicles) and lower pregnancy rate have been identified (Carvalho, 2002; Zicarelli, 1997; Baruselli, 2001; Ohashi, 2017). Therefore, several strategies to decrease the early embryonic mortality rate in embryo recipient females were promoted, including increasing the number and growth rate of the corpus luteum (CL) and the size of the preovulatory follicle by generating a larger CL, and consequently higher progesterone (P4) production post ovulation (Vasconcelos, 2001).

In the luteinization phase, which takes place immediately after ovulation with the formation of the CL, the P4 secretion occurs exponentially, and exerts an inhibitory effect on prostaglandin F2 alpha (PGF2 α) secretion at the level of oxytocin (OT) genes, besides blocking estrogen (E2) production, and stimulating the accumulation of arachidonic acid and cyclooxygenase enzymes in the endometrium (Santos, 2001; Thatcher, 2001). On the other hand, in the luteolytic phase, the secretion of PGF2 α by the endometrium begins between the 15th and 18th day of estrous cycle, a time when there is no fertilization of the oocyte or presence of a viable embryo (Arosh, 2002; Tanikawa, 2005). This phase is directly associated with PGF2 α synthesis and expression of cyclooxygenase 2 (Cox-2) enzyme (Cardoso, 2020). Interestingly, in cows the PGF2 α can be secreted by CL cells after transrectal uterine manipulation during ET procedure and consequently induce positive endometrial feedback with activation of Cox-2 leading to luteolytic function (Diaz, 2002). Therefore, substances that inhibit Cox-2 synthesis such as fatty acids (e.g., linoleic acid) and nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are fundamental to increase pregnancy rates (Cardoso, 2002; Mosquini, 2011; Wasfi, 2015). Importantly, flunixin meglumine (FM) is one of the most used drugs in bovine reproductive procedures due to its prostaglandin inhibitory action generated by substances that metabolize arachidonic acid, the cyclooxygenases enzymes and lipoxygenase (Hockett, 2004; Aké-López, 2005; Pugliesi, 2012). Importantly, its bioavailability can reach 60% in cattle and 86% in horses (Aké-López, 2005; Pugliesi, 2012).

A previous report (Odensvik, 1998) identified an important delay in the luteolytic process after administration of FM granules in heifers, being positively correlated with inhibition of PGF2 α synthesis in the endometrium and, therefore, maintenance of CL. In addition, other studies in cattle (Hockett, 2004; Aké-López, 2005; Pugliesi, 2012; Odensvik, 1998) observed a decrease in endometrial PGF2 α synthesis and embryo death, and consequently an increase in the pregnancy rate in cows after administration of NSAIDs at the time of ET. In parallel, the decrease in embryonic mortality rates has been associated with the increase in the inter-estrus interval *after* FM application, providing a prolonged estrous cycle and an increased secretion of interferon tau (IFN- τ), supporting, therefore, embryo-maternal recognition (Aké-López, 2005).

It's important to indicate that utilization of FM varies according to the literature, e.g. the dose of 2.2 mg/kg flunixin meglumine every eight hours starting on day 14 or 15 of the estrous cycle increased the average estrous cycle duration and maintenance of CL in heifers (Odensvik, 1998). While another study (Pugliesi, 2012) identified reduced PGF2 α concentration before and during luteolysis and delayed onset of the P4 decline in heifers treated with flunixin meglumine (2.5 mg/kg, every eight hours). Another important alternative drug to FM is firocoxib (FIRO), which also have a potential to inhibit PGF2 α secretion, however, to our knowledge, no reports have been identified for buffaloes. FIRO is a highly Cox-2 selective drug, furthermore, due to its lipophilic property the drug reaches absolute plasma bioavailability after 3.9 hours, presenting a half-life of 30 hours (Kvaternick, 2007). In horses, FIRO demonstrated anti-inflammatory action at a dose of 0.1 mg/kg every 24 hours (Stock, 2015). Since PGF2 α release in the endometrium of bovine females can occur during ET and considering that NSAIDs inhibit cyclooxygenases enzymes, consequently prostaglandin synthesis in the luteal phase, it is believed that these drugs could favor a longer luteal phase and consequently better pregnancy rates in buffaloes.

Therefore, the objective of this study is to test the influence of a single application of FM and FIRO at the time of manipulation of the reproductive tract of buffaloes on the estimated area of CL and plasma concentration of P4.

2. Materials and methods

The methodology adopted in the present study was reviewed and approved by the Animal Care Committee on Animal Use (CEUA) of the College of Veterinary Medicine and Animal Science (CVMAS) of the São Paulo State University (Unesp), Botucatu, São Paulo (SP) under the protocol no. 0109/2019 (CEUA - n. 0177/2018).

2.1 Animals and experimental environment

A total of 29 healthy multiparous Murrah buffalo females aged between four and eight years from the Registro Research and Development Unit (Polo Regional do Vale do Ribeira, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – Agribusiness and technology Agency from the state of São Paulo), São Paulo (SP), Brazil. The study was conducted during fall and winter seasons, considered the seasons of the year of higher reproductive activity.

The animals were kept on *Brachiaria* spp. pasture with *ad libitum* access to water and mineral supplement. Animal health was determined by a clinical record, which was regularly updated by the research unit where the animals were housed and included physical examination, rectal palpation and rectal ultrasound examination.

The inclusion criteria in the study was the confirmation of cyclic ovarian activity, postpartum period greater than 90 days and body score equal to or greater than three points (scale of zero to five points). Females with systemic comorbidities and body score conditions below three points were excluded from the study.

2.2 Synchronization of estrus

The animals were subjected to estrus synchronization on day -10 (D-10): Application of estradiol benzoate [2 mg/kg, IM (Sincrodiol[®], Ouro fino Saúde Animal, Cravinhos, Brazil) associated with an intravaginal progesterone pessary (Sincrogest[®], Ouro fino Saúde Animal, Cravinhos, Brazil). Nine days after the start of estrous synchronization (D-2) the progesterone pessary was removed, and PGF2 α (2 mg/kg/IM) (Sincrocio[®], Ouro fino Saúde Animal, Cravinhos, Brazil) and equine chorionic gonadotropin (eCG) (2 mg/kg/IM) (Sincro eCG[®], Ouro fino Saúde Animal, Cravinhos, Brazil) were given to each animal. After 24 h after synchronization (D-1) estradiol benzoate (EB) was administered at a dose of 1 mg/kg (IM).

It was considered that ovulation would occur around 24 to 48 h after EB application (in accordance with the described by the manufacturer), this was named as day 0 (D0) of the cycle (Fig. 1). Six days (D6) after the ovulation all females were submitted to a reproductive tract manipulation, similarly to performed for embryo transfer procedure, each manipulation was preceded by ultrasound examination that determined the CL characteristics.

The animals were randomly divided into three groups: Control Group (G1, n = 9), no NSAIDs applied; Experimental Group FM (G2, n = 10), single intravenous application of 1.1 mg/Kg on the day of reproductive tract manipulation (D6); Experimental Group FIRO (G3, n = 10), single intravenous application of 0.1 mg/Kg on the day of reproductive tract manipulation (D6) (Fig. 1).

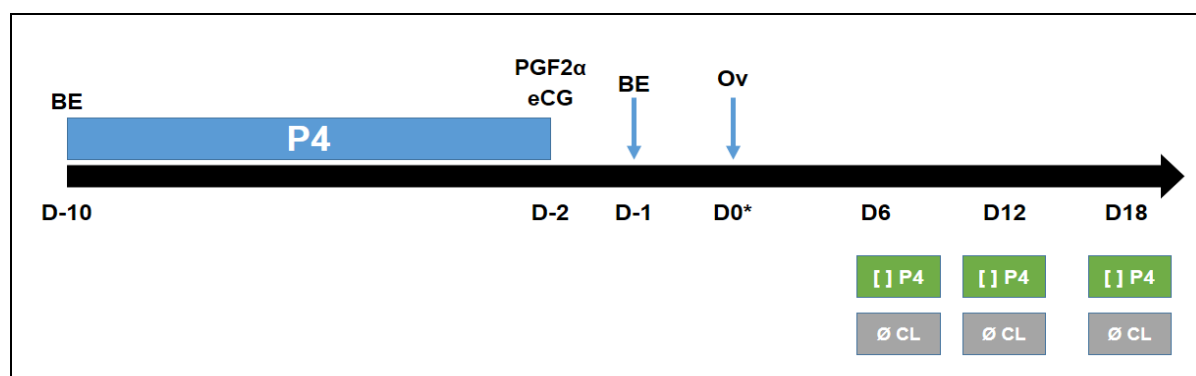


Fig. 1. Protocol applied in female buffaloes for synchronization and detection of estrus. D-10: first day of estrous synchronization; D-2: nine days after the beginning of synchronization; D-1: ten days after the beginning of estrous synchronization; D0*: ovulation day; D6: six days after ovulation, day of manipulation of the reproductive tract of females and application of treatments; D12: twelve days after ovulation; D18: eighteen days after ovulation; EB: estradiol benzoate; P4: application of the progesterone pessary; PGF2α: prostaglandin F 2α analog; eCG - equine chorionic gonadotrophin; Ov: ovulation day; [] P4: measurement of plasma levels of progesterone concentration; ØCL: estimation of the area of the CL.

2.3 Manipulation of the female reproductive tract

For manipulation of the reproductive tract, all animals received a caudal epidural analgesia with 4 mL of lidocaine hydrochloride (2%). The vulva and perineal region were cleaned with water and paper towels. The embryo transfer syringe (ETS) (Model 007239, IMV Technologies, Campinas, Brazil) protected by a sanitary plastic cover was introduced at the bottom of the vagina by means of rectal palpation, and after passing through the cervix the sanitary cover was torn off from the syringe. Subsequently, the ETS was positioned in the distal region of the uterine horn corresponding to the ovary with the CL previously identified by ultrasound examination. The manipulations were graded using the three-point score associated with the difficulty of positioning the syringe in the uterine horn (score 1 - easy positioning; score 2 - average positioning difficulty; score 3 - high positioning difficulty).

2.4 Ultrasound examination

The transrectal ultrasound examinations were performed with the animals in station by means of physical restraint. For this purpose, an ultrasound device (model SSD 500, Aloka[®], Aloka Co., Tokyo, Japan) and a linear transducer (Aloka Co., Tokyo, Japan) at a frequency of 5 MHz was used. The estimated areas for CL were evaluated according to previous study [50] and measuring a cross sectional diameter of the CL the following times: six days after ovulation, at the time of reproductive tract manipulation (D6), 12 days after ovulation (D12), and 18 days after ovulation (D18).

2.5 Quantification of progesterone concentration

The blood sampling for plasma P4 quantification was performed immediately after the ultrasound examinations (D6, D12, and D18). For this, 5 mL blood samples were collected from the jugular vein using 21G gauge needles and stored into tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). The tubes were kept in a refrigerated Styrofoam box until the moment of centrifugation. The samples were then centrifuged at 2.500 RPM for 15 min. The plasma was collected in labeled 2 mL tubes and stored at - 80° C until utilization. The plasma P4 concentrations were determined by means of commercial solid-phase kits and readings by radioimmunoassay method (model 1470 Gamma. Counter, Perkin Elmer) following the manufacturer's instructions (variation intra-assay of 8.15%; variation inter-assay of 8.66% and analytical sensitivity of 0.03 ng/mL).

2.6. Statistical analysis

All data points were analysed regarding normality. Estimates of corpus luteum area plasma P4 concentrations were compared between days, within each group, by ANOVA repeated measures analysis of variance, contrasted by Tukey's method with p-value adjustment by Bonferroni's method. All analyses were conducted in the R Program, adopting 5% significance level (R Development Core Team, 2020).

3. Results

Based on the analyses performed, it was interesting to observe that while the treated groups maintained similar CL sizes (mm^2) throughout the experiment ($P > 0.05$, Fig. 2), the Control group presented a significant reduction ($P < 0.05$) when comparing D6 and D12 to D18 ($P < 0.06$; Fig. 2).

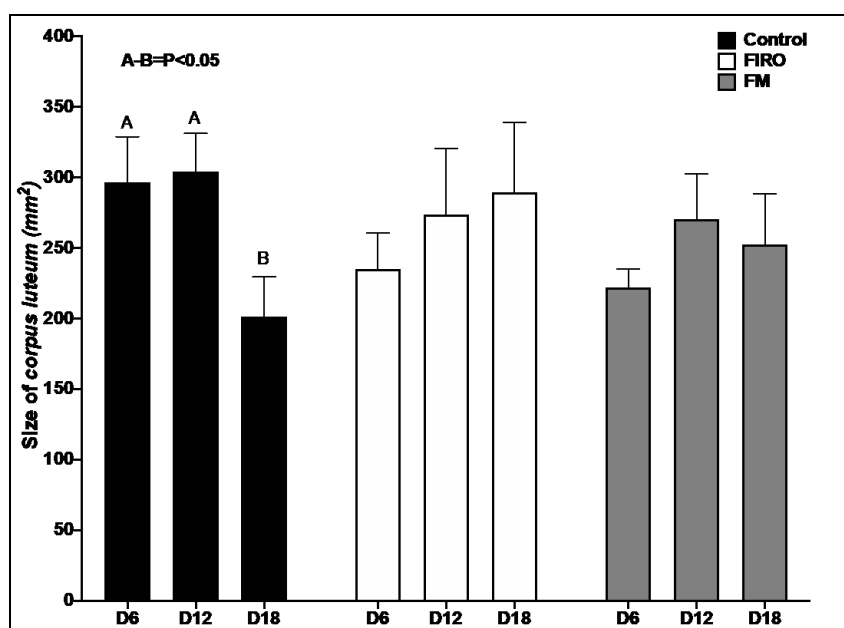


Fig. 2. Means $\pm$ SEM (vertical lines applied to the bars) of the estimated areas for the corpus luteum in buffaloes submitted to reproductive tract manipulation, according to treatment and time after manipulation (days). Different letters indicate $P < 0.05$.

Legend: FIRO = Firocoxib, FM = flunixin meglumine.

When considering the plasma progesterone concentration (ng/mL) it was observed that for all groups, a significant increase ($P < 0.05$) was observed on D12, followed by an important decrease on D18 ($P < 0.05$) (Fig. 2). However, it's important to indicate that both FM and FIRO group at D18 were able to maintain a higher progesterone concentration when compared to Control group ($P < 0.05$, Fig. 3).

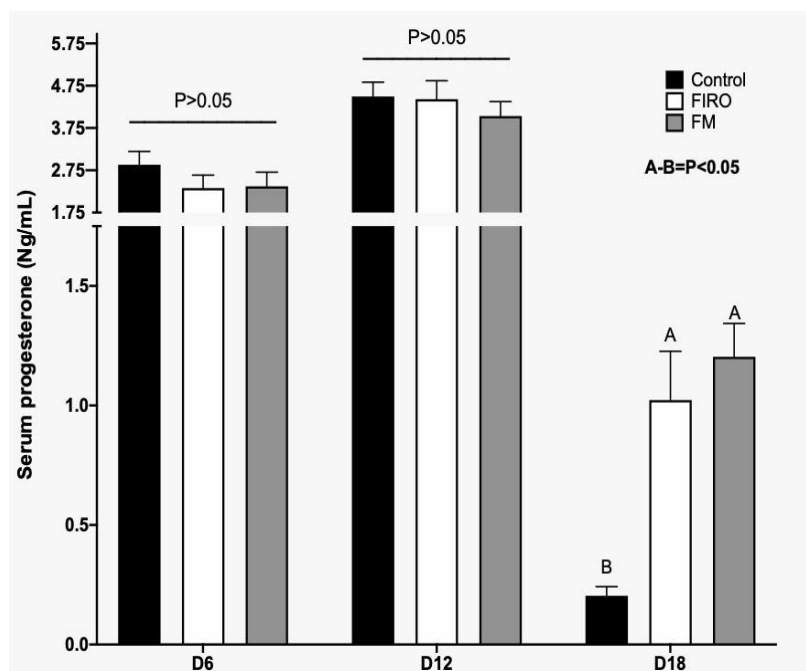


Fig. 3. Means $\pm$ SEM (vertical lines applied to the bars) of the plasma P4 dosages in buffaloes subjected to uterine manipulation, according to treatment and time after manipulation (days). Legend: FIRO = Firocoxib, FM = flunixin meglumine; CL = corpus luteum. Different letters indicate $P < 0.05$.

4. Discussion

To our knowledge, there are no studies investigating the impacts of Firocoxib in the reproductive cycle of buffaloes. However, few studies regarding its anti-inflammatory activity were described in horses (Kvaternick, 2007), pre-weaned calves (Stock, 2015), adult goats (Stuart, 2019) and dogs (Davila, 2013). Therefore, the present study was considered the first to identify the influence of FIRO on the buffalo luteal phase. Importantly, the results of the study indicated that FM and FIRO could act against iatrogenic luteal insufficiency caused by manipulation of the reproductive tract during the estrus cycle.

The main findings that attested to this information were the significant reduction identified in the estimate of the CL area in the Control Group ($P < 0.05$) at D18 when compared to FIRO and FM that preserved the CL size throughout the study ($P > 0.05$). This result is similar to the observed in cattle (Cardoso, 2020), in which the control group presented decrease in the CL size at D18 after ovulation, while animals treated with FM maintained the CL size throughout the study (Cardoso, 2020).

Furthermore, some studies have already described the beneficial effects of NSAIDs in blocking luteal dysfunction after manipulation of the reproductive tract of cows, when a dose of FM of 1,1 mg/Kg was given, with the main pathway of action being the reduction in the conversion of arachidonic acid into prostaglandins (Mosquini, 2011; Malik, 2019). The same authors demonstrated a decrease in $\text{PGF}_{2\alpha}$ production, higher P_4 concentrations and improvement in the prolongation of the luteal phase when COX-1 selective drugs were used. Therefore, our results indicate that the COX-1 and COX-2 selective drugs have great potential to prolongate the luteal phase in buffaloes. Importantly, due to often-long half-life of the drugs of this group, a single dose can be given, supporting the luteal phase without demanding major management and handling modifications (Kvaternick, 2007).

Lastly, although the inhibition of COX-2 alone is sufficient to prevent inflammatory reactions, and the undesirable side effects related to COX-1 inhibition, the continuous utilization of COX-2 inhibitory drugs can also cause negative impacts such as reduction in blood flow and suppression of PGE production by the gastric mucosa (Brzozowski, 2001). Therefore, the fact that both FIRO and FM presented important results in prolonging the luteal phase, future studies combining COX-1 and COX-2 inhibitory drugs to potentiate the results and reduce the side effects.

Similar activity of FM and FIRO was also observed in goats, in which the premature regression of the CL was prevented in females subjected to super ovulation, through their major effect on the inhibition of prostaglandin synthesis (Traldi, 1996, Salles, 1998. The utilization of inhibitors of prostaglandin synthesis at the day of ovulation and embryo recovery can prevent the iatrogenic luteal insufficiency, maintaining the size of the CL and increasing the numbers of embryos recovered (Traldi, 1996; Battye, 1988].

Another study indicated that the application of FM retarded the luteolysis even when the luteolytic process was already ongoing (Aké-Lopez, 2005), the findings were supported by longer luteal phase as well as higher birth rate in ewes treated with a dose of 2.2 mg/Kg of FM. Lastly, the utilization of FIRO and FM produced an increase in CL size at D12 and D18 when compared to control animals, both heifers and cows presented similar results (Traldi, 1996; Kastelic, 1990; Viana, 2007; Acosta, 2003; Borges, 2003; Sartori, 2004).

Importantly, the results on D18 indicate that both treatments (FM and FIRO) were able to maintain better levels of P4 ($P < 0.05$) than the control group at D18. Another study corroborates with the finding indicated above; the utilization of FM prevented the reduction on P4 concentrations in cows subjected to reproductive tract manipulation (Cardoso, 2020). Importantly, both FIRO and FM, similarly to the observed in our study, maintained better levels of PG4 when compared to control animals at D18 after manipulation of the tract, possibly, the handling of the reproductive tract stimulated the release of PFG2 by the endometrium and the COX-1 and COX-2 inhibitors were able to prevent its synthesis in the treated animals (Cardoso, 2020). Similarly, a decrease in progesterone in control groups as observed after manipulation of reproductive tract, while the treated groups presented only a gradual reduction (Pinto-Neto, 2008). In addition, the utilization of FM in heifers maintained the progesterone levels during the treatment and reducing the concentration of 15-cetodihydro-PGF2 α , a prostaglandin metabolite, retarding, therefore, the starting of luteolysis (Aké-Lopez, 2004; Aiumlamai, 1990; Leal, 2008). However, more studies are required to identify if the same is observed in buffaloes.

The importance of preventing a decrease in P4 levels in buffaloes is major, since in other species, it was shown that an appropriate pattern in P4 production after ovulation was strongly related to successful recognition of pregnancy (Mann, 2001); since cows that had higher P4 concentrations by day 16 after insemination had larger conceptuses, and consequently higher IFN- τ concentrations (Mann, 2001). Furthermore, high concentrations of IFN- τ are necessary to block the production of oxytocin receptors in the endometrium, consequently blocking the release of PGF2 α , and thus preventing luteolysis (Mann, 2001; Brzozowski, 2001). These mechanisms of maternal-fetal recognition and luteolysis have been described in buffaloes (Traldi, 1996; Salles, 1998) and this observation is strongly associated with the function of the NSAIDS used in our study, the indicate great potential in preventing luteolysis and prolonging the luteal phase.

Furthermore, the CL when present in the ovaries of the buffaloes occupies a large portion of the organ (Fields, 1990). Since the CL is the main source of progesterone, it's responsible for the promotion of an adequate uterine environment for embryo development, more specifically from 14-17^o day after ovulation until the embryo-maternal recognition (Brzozowski, 2001). The maintenance of higher levels of progesterone and CL size in the treated animals indicate that both FM and FIRO have great potential to support the luteal phase in this species.

Lastly, the importance of this study relays in novelty of its perspective and in the identification of the function of NSAIDS in the reproductive tract in buffaloes, with the potential to prevent decrease in progesterone and prolong the luteal phase, however, further studies are indicated to study the application in embryo transfer and birth rate, as well as identification of an optimal dose of FIRO and FM in female buffaloes.

5. Conclusion

The use of FM and FIRO in a single application is beneficial in preventing a sharp drop in P4 concentrations in the critical period for conception in female buffaloes.

6. Conflict of interest

The authors declare that no conflict of interest could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

7. Funding

Financial support from São Paulo Research Foundation (FAPESP) (process number: 2019/14353-9), and Higher Education Improvement Coordination – Brazil (CAPES), financing code 001.

8. Credit authorship contribution statement

A.F.V was involved in all aspects of the project, from initial concept to writing the manuscript. N.C, J.S, V.M.C., R.R.F., E.S.J. and J.D. provided critical technical support during the experiment. R.G., B.C.L., G.R. and L.C.M. were involved in the sample evaluation, statistical analyses and writing/editing the manuscript. Lastly, E.O. was engaged throughout the study, besides supervising the project. All authors were involved in the writing process and preparation of figures. Furthermore, all authors reviewed the final version.

9. Acknowledgments

We thank the coordination and personnel from Agribusiness and Technology Agency from the state of São Paulo, Brazil (APTA), São Paulo State University, Botucatu, São Paulo, Brazil (UNESP) and Botupharma Veterinary Products (Botucatu, São Paulo, Brazil) for the support provided during the study.

10. References

Acosta T. J., Hayashi K. G., Ohtani M. & Miyamoto A. (2003). Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. *Reproduction*, 125: 759-767. DOI: 10.1530 / rep.0.1250759.

Aiumlamai S., Odensvik K., Stabenfeldt G. & Kindahl, H. (1990). Regulation of prostaglandin biosynthesis with flunixin meglumine in the bovine species. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 37: 1-10, 16-22. DOI: 10.1111 / j.1439-0442.1990.tb00871.x.

Aké-López R., Segura-Correa J. C. & Quintal-Franco J. (2005). Effect of flunixin meglumine on the corpus luteum and possible prevention of embryonic loss in Pelibuey ewes. *Small Ruminant Research*, 59(1): 83–87. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2004.11.008.

Arosh J. A., Parent J., Chapdelaine P., Sirois J. & Fortier M. A. (2002). Expression of cyclooxygenases 1 and 2 and prostaglandin E synthase in bovine endometrial tissue during the estrous cycle. *Biology and Reproduction*, 67(1): 161–169. DOI: 10.1095/biolreprod67.1.161.

Baruselli P. S., Bernardes O., Barufi F. B., Braga D., Araujo D. & Tonhati, H. (2001). Calving distribution throughout the year in buffalo raised all over Brazil. *Proceedings of World Buffalo Congress*. 234-240.

Battye K. M., Fairclough R. J., Cameron A. W. N. & Trownson A. O. (1988). Evidence for prostaglandin involvement in early luteal regression of the super ovulated nanny

goat (*capra hircus*). Journal of Reproduction and Fertility, 84: 425-430. DOI: 10.1530/jrf.0.0840425.

Borges A. M., Torres C. A. A., Ruas J. R. M., Júnior V. R. R., Carvalho G. R., Fonseca J. F., Marcatti Neto A. & Assis A. J. (2003). Características da dinâmica folicular e regressão luteal de vacas das raças Gir e Nelore após tratamento com cloprostenol sódico. Revista Brasileira de Zootecnia, 32: 85-92. DOI: 10.1590/S1516-35982003000100011.

Brzozowski T., Konturek P. C., Konturek S. J., Sliwowski Z., Pajdo R., Drozdowicz D., Ptak A. & Hahn, E. G. (2001). Classic NSAID and selective cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 inhibitors in healing of chronic gastric ulcers. Microscopy Research and Technique, 53(5): 343–353. DOI: 10.1002 / jemt.1102.

Campanile G., Baruselli P. S., Neglia G., Vecchio D., Gasparrini B., Gimenes L. U., Zic L. & Occhio M. J. (2010). Ovarian function in the buffalo and implications for embryo development and assisted reproduction. Animal Reproduction Scientific, 121(1): 1-11. DOI: 10.1016 / j.anireprosci.2010.03.012.

Cardoso R. C., Codognoto V. M., Lainetti P. F., Yamada P. H., Rizzoto G., Salgado L. C., Araújo M. S., Vieira A. F., Marques N. S. & Oba E. (2020) Pregnancy rates and luteal phase characteristics of bovine embryo recipients treated with flunixin meglumine. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 72(4): 1085-1092. DOI: 10.1590/1678-4162-11502.

Carvalho N. A. T., Baruselli P. S., Zicarelli L., Madureira E. H., Visintin J. A. & D'Occhio M. J. (2002). Control of ovulation with a GnRH agonist after superstimulation of follicular growth in buffalo: fertilization and embryo recovery. Theriogenology, 58(9): 1641-1650. DOI: 10.1016 / s0093-691x (02) 01057-9.

Davila D., Keeshen T. P., Evans R. B. & Conzemius M. G. (2013). Comparison of the analgesic efficacy of perioperative firocoxib and tramadol administration in dogs undergoing tibial plateau leveling osteotomy. Journal of American Veterinary Medicine Association, 243: 225-231. DOI: 10.2460/javma.243.2.225.

Diaz F. J., Anderson L. E., Wu Y. L., Rabot A., Tsai S. J. & Wiltbank M.C. (2002). Regulation of progesterone and prostaglandin F2 α production in the CL. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 191: 65-80. DOI: 10.1016 / s0303-7207 (02) 00056-4.

Fields M. J. & Fields, P. A. (1990). Morphological characteristics of bovine corpus luteum during the estrous cycle and pregnancy. *Theriogenology*, 45: 1295-1355. DOI: 10.1016 / 0093-691x (96) 00099-4.

Hockett M., Rohrbach N. & Schrick, F. (2004). Alterations in embryo development in progestogen-supplemented cows administered prostaglandin F2 α . *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 73: 227–236. DOI: 10.1016/j.prostaglandins.2004.02.002.

Kastelic J. P., Bergfelt D. R. & Ginther, O. J. (1990). Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. *Theriogenology*. 33: 1269-1278. DOI: 10.1016/0093-691X(90)90045-U.

Kvaternick V., Pollmeier M., Fischer J. & Hanson P. D. (2007). Pharmacokinetics, and metabolism of orally administered firocoxib, a novel second generation coxib, in horses. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 30(3): 208–217. DOI: 10.1111 / j.1365-2885.2007.00840.

Leal L. S. Estudo morfofisiométrico de ovários e maturação ovocitária in vitro em bubalinos e bovinos nas diferentes fases da atividade reprodutiva. (2008). PhD Thesis in Veterinary Medicine Tese – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Malik A., Rasad S., Kumar S., Mathani M. & Gupta, H. P. (2019). Effect of flunixin meglumine on conception rate following embryo transfer in crossbred cattle. *Indian Journal of Animal Reproduction*, 40: 5–10.

Mann G. E. & Lamming, G. E. (2001). Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction*, 121: 175–180. DOI: 10.1530 / rep.0.1210175.

Mosquini A. F., Zappa V., Montanha F. P. (2011). Características farmacológicas dos anti-inflamatórios não esteroidais - Revisão de Literatura. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, 17: 1–7.

Oba E., Coelho K. M., Vieira R. J., Pinto, N. F., Chacur M. G. M., Ferreira J. C. P. & Kanagawa H (2003). Estudo preliminar de superovulação e colheita de embriões em búfalas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 32: 23-29.

Odensvik K., Gustafsson H. & Kindahl H. (1998). The effect on luteolysis by intensive oral administration of flunixin granules in heifers. *Animal Reproduction Science*, 50(2): 35–44. DOI: 10.1016 / s0378-4320 (97) 00090-0.

Ohashi O. M., Nogueira N., Cordeiro Filho S., Ribeiro L. & Guimarães, T. V. (2017). Produção in vitro de embrião (PIVE) na espécie bubalina. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 41(1): 195–200.

Pereira E. C. M. (2015). Produção de oócitos e embriões bubalinos: efeitos da época do ano e da adição de óleo essencial de *Lippia origanoides* na maturação in vitro. PhD Thesis in Veterinary Medicine, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

Pinto Neto A., Lucca F. M., Alberton J., Mota M. F., Lucacin E., Borges A. M., Brandão F. Z. (2008). Avaliação dos efeitos do flunixin meglumine sobre a concentração sérica de progesterona e ciclo estral em novilhas e vacas mestiças. Embrapa Caprinos e Ovinos. Artigo em periódico indexado (ALICE). DOI: 10.4322/rbcv.2014.198.

Pugliesi G., Khan F. A., Hannan M. A., Beg M. A., Carvalho G. R. & Ginther O. J. (2012). Inhibition of prostaglandin biosynthesis during postluteolysis and effects on CL regression, prolactin, and ovulation in heifers. *Theriogenology*. 78(2): 443–454. DOI: 10.1016 / j.theriogenology.2012.02.024.

Salles H. O., Soares A. T., Andrioli A., De Moura Sobrinho P. A. & Azevedo H. C. (1998). Diferentes posologias de flunixin meglumine na prevenção da regressão prematura de corpos lúteos em cabras superovuladas. Embrapa Caprinos e Ovinos. Artigo em periódico indexado (ALICE).

Santos J. E. P., Thatcher W. W., Pool L. & Overton M. W. (2001). Effect of human chorionic gonadotropin on luteal function and reproductive performance of high-producing lactating Holstein dairy cows. *Journal of Animal Science*, 79(11): 2881–2894. DOI: 10.2527 / 2001.79112881x.

Sartori R., Souza A. H., Guenther J. N., Caraviello D., Geiger L. N., Schenk J. L. & Wiltbank M. C. (2004). Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. *Animal Reproduction*, 1: 86-90.

Soares J. G. (2015). Estratégias para aumentar a recuperação de estruturas embrionárias de búfalas superovuladas. PhD Thesis in Veterinary Medicine, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Stock M .L., Millman S. T., Barth L. A., Van Engen N. K., Hsu W. H., Wang C. & Coetzee J. F. (2015). The effects of firocoxib on cautery disbudding pain and stress responses in preweaned dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 98: 6058-6069. DOI: 10.3168/jds.2014-8877.

Stuart A. K., KuKanich B., Caixeta L. S., Coetzeen J. F. & Barrell, E.A. (2019). Pharmacokinetics and bioavailability of oral firocoxib in adult, mixed-breed goats. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 42(6): 640-646. DOI: 10.1111/jvp.12795.

Tanikawa M., Acosta T. J, Fukui T., Murakami S., Korzekwa A., Sharzynshi D. J., Piotrowska K. K, Parck C. K, Okuda K. (2005). Regulation of prostaglandin synthesis by interleukin - 1 α in bovine endometrium during estrous cycle. *Prostaglandin and Other Lipid*, 78: 279-290. DOI: 10.1016 / j.prostaglandins.2005.09.003.

Thatcher W. W., Guzeloglu A., Mattos R., Binelli M., Hansen T. R. & Pru, J. K. (2001). Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. *Theriogenology*. 56(9): 1435–1450. DOI: 10.1016 / s0093-691x (01) 00645-8.

Traldi A. S., Visintin J. A., Mizuta K., Dela Libera A. M. P., Silva E. C. & Rodrigues P. H. M. (1996). Resposta superovulatória de caprinos à gonadotrofina da menopausa humana (hMG). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 24: 218.

Vasconcelos J. L. M., Sartori R., Oliveira H. N., Guenther J. G. & Wiltbank M. C. (2001). Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology*, 56 (2): 307–314. DOI: 10.1016 / s0093-691x (01) 00565-9.

Viana J. H. M., Ferreira A. M. & Sá W. F. (2007). Follicular dynamics in Zebu cattle. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35: 2501-2509. DOI: 10.1590/S0100-204X2000001200021.

Wasfi I. A., Saeed H. M., Agha B. A., Kamel A. M., Biriki N. A., Neaimi K. M., Sultan S. M. (2015). Pharmacokinetics and metabolism study of firocoxib in camels after intravenous administration by using high-resolution bench-top orbital mass spectrometry. *Journal of Chromatology*, 974: 17–23. DOI: 10.1016 / j.jchromb.2014.10.021.

Zicarelli L. (1997). Superovulatory response in buffalo bred in Italy. *Bubalus bubalis*, 4: 167-188.

ANEXOS (ARTIGOS PUBLICADOS)



Recebido: C. Cardoso
<https://orcid.org/0000-0002-2446-0205>
 Viviane M. Codagnato
<https://orcid.org/0000-0003-4538-5124>
 Patrícia F. Lins
<https://orcid.org/0000-0001-8271-7608>
 Paulo S. Yamada
<https://orcid.org/0000-0001-8872-8917>
 Gullerius S. Leite
<https://orcid.org/0000-0002-8423-8858>
 Letícia Oliveira Salgado
<https://orcid.org/0000-0003-8420-8892>
 Michelle Silva Araújo
<https://orcid.org/0000-0002-1766-8844>
 Anderson Pôrto Vieira
<https://orcid.org/0000-0003-8834-8158>
 Nayara Fernanda Silva Marques
<https://orcid.org/0000-0002-4515-0365>
 Emerson Oba
<https://orcid.org/0000-0003-0333-7417>

Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.72, n.4, p.1085-1092, 2020

Pregnancy rates and luteal phase characteristics of bovine embryo recipients treated with flunixin meglumine

[Taxas de prenhez e características da fase lútea de receptoras de embriões tratadas com flunixin meglumina em bovinos]

R.C. Cardoso¹, V.M. Codagnato^{1*}, P.F. Lins¹, P.H. Yamada¹, G. Rizzoto², L.C. Salgado¹,
 M.S. Araújo¹, A.F. Pereira¹, N.F.S. Marques¹, E. Oba¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FMVZ-UNESP – Botucatu, SP

²Faculty of Veterinary Medicine – University of Calgary – Calgary – AB, Canada

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of flunixin meglumine administration on pregnancy rates and luteal phase characteristics in bovine embryo recipients at the moment of embryo transfer. In experiment 1, in vitro produced embryos were transferred to 184 females divided as control and treated group (recipients treated with 1.1mg/kg flunixin meglumine). In experiment 2, 22 females were divided as control group; group 2 (animals submitted to a reproductive tract manipulation similar to an embryo transfer on the 7th day after estrous); and group 3 (females submitted to a manipulation and treatment with 1.1mg/kg flunixin meglumine). In experiment 1 no difference was observed between control and treated groups (40.2% and 44.6%, respectively) for pregnancy rates. In experiment 2 no difference was observed on the length of luteal phase between groups, however, animals in group 2 presented lower plasma progesterone concentrations than the control group and group 3. Therefore, we concluded that although the administration of flunixin meglumine at the moment of embryo transfer inhibited the reduction plasma progesterone concentrations, it was not effective in increasing pregnancy rates of bovine recipients.

Keywords: Bos taurus, flunixin meglumine, corpus luteum, progesterone

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da administração de flunixin meglumina sobre as taxas de prenhez e características da fase lútea da receptora no momento da transferência de embriões em bovinos. No experimento 1, embriões produzidos in vitro foram transferidos para 184 fêmeas, divididas em grupos controle e tratado (tratados com 1,1mg/kg de flunixin meglumina). No experimento 2, 22 fêmeas foram divididas em grupo controle (n=7); grupo 2 (n=8; animais submetidos à manipulação do trato reprodutivo semelhante à transferência de embriões no sétimo dia pós-estro); e grupo 3 (n=7; fêmeas submetidas à manipulação e ao tratamento com 1,1mg/kg de flunixin meglumina). No experimento 1, não foi observada diferença nos grupos controle e tratado (40,2% e 44,6%, respectivamente) para as taxas de prenhez. No experimento 2, não houve diferença na duração da fase lútea entre os grupos, entretanto os animais do grupo 2 apresentaram concentrações plasmáticas de progesterona mais baixas que o grupo controle e o grupo 3. Portanto, conclui-se que a administração de flunixin meglumina no momento da transferência de embriões inibiu a redução das concentrações plasmáticas de progesterona, no entanto não foi eficaz para aumentar as taxas de prenhez de receptoras em bovinos.

Palavras-chave: Bos taurus, flunixin meglumina, corpo lúteo, progesterona

Recebido em 22 de maio de 2019

Aceito em 2 de dezembro de 2019

*Autor para correspondência (corresponding author)

E-mail: viviane.codagnato@gmail.com



Biometria testicular e sua influência no comportamento sexual de búfalos (*Bubalus bubalis*)

Testicular Parameters and its Influence in Buffaloes (*Bubalus bubalis*) Sexual Behaviour

Mariana Hyppolito, Mariana Furtado Zorzetto, Edjalma Rodrigues da Silva-Junior, Stella Maris Teobaldo Tironi, Alessandra Gomes Souza, Viviane Maria Codognoto, Andressa Filaz Vieira, Letícia Cristina Salgado, Nayara Fernanda Silva Marques & Eunice Oba

ABSTRACT

Background: Brazil is one of the greatest bovine meat exporter in the world. However, the technologies applied at buffalo's reproduction is not specific for this specie, adapted techniques were established from the cattle breed. When the animal shows weight gain, gonadal and behavioral physiology follow this tendency and the reproductive status become good and satisfactory. Thus, the aim of this study was to compare the reproduction characteristics of male buffaloes and its testicular parameters with sexual behavior.

Materials, Methods & Results: Seven males Murrah breed with 67.29 ± 11.4 months of age were maintained at confinement for artificial shading. The testicular parameter was performed in restraint trunk and the sexual behavior evaluation was done with an estrus female. The sexual behavior was performed with an estrous female as a dummy. The testicular biometry was measured at the beginning and at the end of the experimental design, with the follow parameters: length, width, depth/thickness, scrotal circumference and the total volume. The data were submitted to the analysis of variance, and the means was compared with the Student-Newman-Keuls test, with significance difference $P < 0.05$ between the medians. The differences in the parameters were scrotal circumference (23.36 cm vs 24.86 cm), testicular length (8.71 cm vs 9.77 cm), right testicular width (8.57 cm vs 9.53 cm) and testicular volume ($1.627.40 \text{ cm}^3$ vs $2.149.68 \text{ cm}^3$), respectively. The sexual behavior showed an increase in the Flehmen reflex, mounts (service capacity) and libido (2.00 vs 11.71; 0.57 vs 5.43; regular behavior vs very good behavior, respectively).

Discussion: An increase in the testicular circumference was observed at the end of the experimental period with the values between 23.36 cm vs 24.86 cm. However, even with this increase of the testicular parameters it is lower than other male buffaloes with 36 months age. In Brazilian conditions, the testicular circumference variation is between 24.5 cm and 34 cm in animals with 60 months of age. These data shows that there are variations of the testicular parameters due to different systems of buffaloes breeding. When compared to cattle, buffaloes shows lower input of reproductive biotechnology. At the same way, the testicular growth and development depends of the nutrition and management used at the farm. In an inefficient system, buffaloes and bovine breeding could lose weight, testicular mass, and reduce testicular parameters. Besides that, the buffaloes can perform an improvement of a general condition when improvement of nutrition care occurs. The testicular parameters presents high correlation with the corporal and testicular development, which can be correlate to age and weight. Those parameters could help with the reproductive ability of the buffalo. The sexual behavior was increased and observed in the Flehmen reflex, service capacity and libido after the animal's adaptation to the reproductive management. The buffaloes are animals extremely adaptable to different conditions, but need a period to adapt. Previous sexual experience is important during the social organization of the harem and helps in the practice of the sexual act. In these experimental conditions, we conclude that is necessary a social and behavior adaptation to the buffalo bull to present a better value of sexual characteristics to improve the fertility and production of Murrah buffaloes.

Keywords: adaptability, andrology, behavior, reproductive management.

DOI: 10.20656/1679-9216.96825

Received: 22 July 2019

Accepted: 17 November 2019

Published: 8 December 2019

Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, UNESP, Botucatu, SP, Brazil.
CORRESPONDENCE: E.R. Silva-Junior [edjalma.vet@hotmail.com]. Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, School of Veterinary Medicine and Animal Science - UNESP, CEP 18.610-970 Botucatu, SP, Brazil.

Received: 13 August 2019 | Accepted: 13 November 2019
DOI: 10.1111/rda.13587

ORIGINAL ARTICLE

Reproduction in Domestic Animals WILEY

Cross comparison of seminal plasma proteins from cattle and buffalo (*Bubalus bubalis*)

Viviane Maria Codognato  | Paulo Henrique Yamada | Rúbia Alves Schmith | Felipe Rydygier de Ruediger | Camila de Paula Freitas-Dell'Aqua | Fabiana Ferreira de Souza | Suzane Brochine | Lucas Monteiro do Carmo | Andressa Filaz Vieira | Eunice Oba

Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, School of Veterinary Medicine and Animal Science (FMVZ), São Paulo State University (UNESP), Botucatu, Brazil

Correspondence

Viviane Maria Codognato, Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, Faculty of Veterinary Medicine, FMVZ, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil.
Email: viviane.codognato@gmail.com

Funding Information

Fund o de Amparo   Pesquisa do Estado de São Paulo, Grant/Award Number: 2016/00603-5

Abstract

The objective of this study was to evaluate seminal plasma proteins from cattle and buffalo (*Bubalus bubalis*), to identify differences between related species. Sixteen buffaloes and 16 cattle between 30 and 60 months of age were used. Semen collection was performed by electroejaculation, followed by macroscopic and microscopic subjective analyses. After analysis, the samples were centrifuged at 800 g for 10 min, and the supernatant (seminal plasma) was recentrifuged at 10,000 g for 30 min at 4 C. The total protein concentration was determined by the Bradford method, and the proteins were digested in solution for mass spectrometry (nLC-MS/MS). Multivariate statistical analysis was used to evaluate the proteomics results by non-hierarchical clustering considering exponentially modified protein abundance index (emPAI). Principal component analysis (PCA) and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) were used for clustering. Proteomics identified 78 proteins, and multivariate analysis showed 4 that were over-expressed in buffaloes (cystatin C, prosaposin, peptide YY and keratin type II cytoskeletal 5) and 9 in cattle (spermadhesin-1, seminal plasma protein PDC-109, ribonuclease 4, metalloproteinase inhibitor 2, acrosin inhibitor 1, seminal ribonuclease, C-type natriuretic peptide, angiogenin-1 and osteopontin). Among the proteins identified in seminal plasma, the C-type natriuretic peptide and metalloproteinase inhibitors were described for the first time in buffaloes. Some protease inhibitors were found over-expressed in buffaloes, and important proteins in seminal plasma of cattle were not identified or were found at lower expression levels in buffaloes, which can contribute to reproductive performance in this species.

KEY WORDS

male, proteomics, semen, spectrometry-mass