

EFFECTO DEL FLUNIXIN MEGGLUMINE EN LA DURACION DEL CICLO ESTRAL Y FASE LUTEA DE OVEJAS PELIBUEY

Effect of flunixin meglumine on the length of the estrous cycle and luteal phase of Pelibuey ewes

JR Aké-López ✉, J Herrera-Camacho, JA Quintal-Franco, JC Segura-Correa

(JRAL, JCSC) Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UADY. Km. 15.5 Carretera Mérida-Xmatkuil, Mérida, Yucatán
alopez@tunku.uady.mx

(JAQF) Centro de Investigación Regional Sureste INIFAP. Km 24.5 Antigua Carretera Mérida-Motul, Mocochá Yucatán.

(JHC) Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales. UMSNH Posta Zootecnia, Km 9.5 Carretera
Morelia-Zinapécuaro, Tarímbaro, Michoacán, CP 58880 josheca@hotmail.com

Nota científica recibido: 01 de mayo de 2009, **aceptado:** 04 de abril de 2011

RESUMEN. Se evaluó el efecto del flunixin meglumine (FM) sobre la longitud de la fase lútea (LFL) y del ciclo estral (LCE) de ovejas Pelibuey, tratadas, IM por ocho días, a partir del día 11 del ciclo estral (estro = día 0) con a) grupo testigo (GT, n = 14) 1.5 ml agua estéril una vez al día (06:00 h) b) FM-1 (n = 14) 2.2 mg kg⁻¹ de FM una vez al día (06:00 h) y c) FM-2 (n = 15) 4.4 mg kg⁻¹ de FM dos veces por día (06:00 y 18:00 h). La LFL (16.0 ± 0.51 d) y LCE (20.5 ± 0.47 d) fueron mayores (p < 0.05) en el grupo FM-2 que en el GT (11.75 ± 0.51 y 17.23 ± 0.47 d, respectivamente) y el FM-1 (13.29 ± 0.55 y 18.76 ± 0.47 d, respectivamente). El FM dos veces al día incremento la LFL y la LCE en ovejas Pelibuey.

Palabras clave: Ovejas Pelibuey, ciclo estral, fase lútea, flunixin meglumine.

ABSTRACT. The effect of flunixin meglumine (FM) on the length of the luteal phase (LFL) and estrous cycle (LCE) of Pelibuey ewes was evaluated. The ewes were treated, IM for eight days, starting on day 11 of the estrous cycle (oestrus = day 0), considering a) a control group (GT, n = 14) 1.5 ml sterile water once a day (06:00 h), b) group FM-1 (n=14) 2.2 mg kg⁻¹ of FM once a day (06:00 h) and c) group FM-2 (n=15) 4.4 mg kg⁻¹ of FM twice a day (06:00 and 18:00 h). Both the LFL (16.0 ± 0.51 d) and LCE (20.5 ± 0.47 d) were longer (p < 0.05) in group FM-2 than in group GT (11.7 ± 0.51 and 17.2 ± 0.47 d, respectively) and group FM-1 (13.3 ± 0.53 and 18.8 ± 0.47 d, respectively). The application of FM twice a day increased the LLP and the LCE in Pelibuey ewes.

Key words: Pelibuey ewes, estrous cycle, luteal phase, flunixin meglumine.

INTRODUCCIÓN

En los rumiantes el útero es considerado el sitio más importante para la síntesis de prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) durante la fase lútea del ciclo estral (Charpigny G, Réinaud P, Créminon C, Tamby JP 1999. Journal of Reproduction and Fertility 117: 315-324), mientras que el cuerpo lúteo es considerado como un reloj biológico del ciclo reproductivo, el cual, a través de la secreción de progesterona (P₄) regula en forma determinante la duración del ciclo estral y es esencial para el mantenimiento de la gestación (Webb R, Woad KJ, Armstrong DG 2002.

Domestic Animal Endocrinology 23: 277-285).

El cuerpo lúteo se encuentra presente en el ovario en la etapa del diestro del ciclo estral de los animales; en las ovejas no gestantes sufre regresión entre los 14 ó 15 días después de la presentación del estro a consecuencia de la secreción episódica de la PGF_{2α} secretada por el útero (Kim S, Choi Y, Spencer ET, Bazer FW 2003. Reproductive Biology and Endocrinology 1:58). Durante la luteólisis la PGF_{2α} es secretada en series de alta amplitud en respuesta a los picos de secreción lútea de oxitocina. En los primeros días de gestación, el útero es menos sensible a la presencia de oxitocina lo que ocasiona

la supresión de la secreción pulsátil de $\text{PGF}_{2\alpha}$ manteniendo un cuerpo lúteo funcional (Charpigny G, Reinaud P, Créminon C, Tamby JP 1999. *Journal of Reproduction and Fertility* 117: 315-324).

En ovejas gestantes, el cuerpo lúteo se mantiene más allá de la fase lútea "normal", a causa de la inhibición de la liberación pulsátil de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Niswender DG, Juengel JL, Silva JP, Rollyson MK, McIntush WE 2000. *Physiological Reviews* 80:2-19) por la acción de una proteína producida por las células trofoblásticas del embrión (Niswender GD, Juengel JL, McGuire WJ, Belfiore CJ, Wiltbank MC 1994. *Biology of Reproduction* 50:239-247; Geary T 2005. *Proceedings of the Range Beef Cow Symposium XIX*), que en los ovinos se conoce como oTP-1 o proteína trofoblástica ovina-1 (Roberts RM, Schalue FT 1990. *Theriogenology* 33:175-183), a este evento se le conoce como reconocimiento materno de la gestación (Nasar A, Rahman A 2009. *Journal of Agriculture and Rural Development* 4:1-7).

Diversos estudios han sido dirigidos a tratar de evaluar los mecanismos involucrados en la regulación de la síntesis y secreción uterina de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Zarco L, Stabenfeldt GH, Quirke JF, Kindahl H, Bradford GE 1988. *Journal of Reproduction and Fertility* 83:517-526; Gilbert DE, Conrood SA, Whiting CJ, Pashen RL 1990. *Theriogenology* 33:230; Silvia WJ, Lewis GS, McCracken JA, Thatcher WW, Wilson L Jr. 1991. *Biology of Reproduction* 45:655-663; Garverick HA, Zollers WG Jr, Smith MF 1992. *Animal Reproduction Science* 28:111-124) principalmente con la finalidad de manipular la fase lútea e incrementar la tasa de gestación (López TJ, Herrera CJ, Aké LJR, Juárez CA, Segura CJC, Sánchez GLG 2008. *Memorias XLIV Reunión Nacional de Investigación Pecuaria*. Mérida, Yucatán, México).

El retraso en la lisis del cuerpo lúteo o el incremento en la duración de la fase lútea puede ser posible mediante la aplicación de gonadotrópina coriónica humana (Santos-Valades S, Seidel GF, Elsdén RP 1982. *Theriogenology* 17:85; Lewis GS, Caldwell DW, Rexroad CE Jr, Dowlen HH, Owen JR 1990. *Journal of Dairy Science* 73: 66), progesterona o sus análogos sintéticos (Palomares NR, De Ondiz SA, Sandoval MJ, Goicochea LIJ, González VD, Soto BE 2005. *Revista Científica, FCV-LUZ*

15:242-251), o bien, tratamientos que inhiben la síntesis de la $\text{PGF}_{2\alpha}$, como la proteína trofoblástica o interferón tau (Ott TL, Mirando MA, Davis MA, Bazer FW 1992. *Journal of Reproduction and Fertility* 95:19-20; Demmers KJ, Derecka K, Flint A 2001. *Reproduction* 121:41-49), la inclusión de ácidos grasos poliinsaturados en la dieta (Cheng Z, Robinson RS, Pushpakumara PGA, Mansbridge RJ 2001. *Journal of Endocrinology* 171:463-473; Caldari TC, Rodríguez SC, Greene ES, Badinga L 2006. *Journal of Dairy Science* 89:971-977) o la aplicación de líquido folicular bovino o equino (Hernández CJ, Zarco QL, Kindahl H, Valencia MJ 2006. *Veterinaria México* 35:55-64).

La aplicación de flunixin meglumine (FM) representa una alternativa viable para mejorar la tasa de gestación en rumiantes (Merrill ML, Ansotegui RP, Burns PD, MacNeil MD, Geary TW 2007. *Journal of Animal Science* 85:1547-1554). Algunos autores (Guzeloglu A, Erdem H, Saribay MK, Thatcher WW, Tekeli T 2007. *Veterinary Record* 160: 404-406) han reportado que la administración de FM alrededor del reconocimiento materno de la preñez favorece el mantenimiento del cuerpo lúteo, incrementando la tasa de sobrevivencia embrionaria temprana mediante un efecto aditivo al proceso antiluteolítico que establece el embrión. El FM es un antiinflamatorio no esteroide, que puede inhibir de manera específica la actividad de la enzima ciclooxigenasa (Cheng Z, Nolan AM, McKellar QA 1998. *Inflammation* 22:353-366) limitando la producción de prostaglandina endoperoxidasa en la ruta metabólica del ácido araquidónico (Hardee GE, Smith JA, Harris SJ 1985. *Research in Veterinary Science* 39:110-112; Odensvick K, Cort N, Basu S 1989. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 12:307-311), que disminuye o evita la síntesis endometrial de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Cort N, Kindahl H 1992. *Acta Veterinaria Scandinavia* 33:245-247; Odensvick K 1995. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 18:254-259; Cheng Z, Nolan AM, McKellar QA 1998. *Inflammation* 22:353-366). Sin embargo, los resultados en cuanto a su uso para alargar la fase lútea son todavía escasos por lo que es necesario realizar más estudios al respecto. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del flunixin

meglumine, sobre la longitud de la fase lútea y del ciclo estral en ovejas Pelibuey

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó entre los meses agosto-octubre 2008 en las instalaciones del Campo Experimental Mococho del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias-Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, en el municipio de Mococho, Yucatán; México, localizado a 21° 06' de latitud norte y 89° 27' de longitud oeste, con clima cálido subhúmedo con lluvias en verano, correspondiente al tipo Aw0 (García ME 1987. Modificaciones al sistema de clasificación climatológica de Köppen. 4ta edición. Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF), a una altura de ocho metros sobre el nivel del mar, con temperatura promedio anual de 25.9° C; la humedad relativa media anual es alrededor de 75-80 % y la precipitación pluvial anual promedio es de 927 mm, distribuida principalmente entre junio y octubre (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática 1993. Anuario estadístico del Estado de Yucatán. México DF).

Cuarenta y tres ovejas de raza Pelibuey; múltiparas (entre dos y cuatro partos) con una condición corporal de tres puntos, en una escala uno a cinco (Russel A 1984. In Practice 5:91-93), sin cría al pie, un promedio de 72.6 ± 6.6 días posparto, sin problemas reproductivos en el último parto y todas manifestaron un celo natural previo al estudio.

Las ovejas se mantuvieron en pastoreo en zacate estrella de África (*Cynodon plectostachyus*) de las 06:00 a las 13:00 h, además se les suministró 250 g oveja/día de un suplemento comercial con 14 % de proteína cruda, agua y minerales *ad libitum*.

El estro en las ovejas fue sincronizado con implantes de silicón impregnados con 3.0 mg de norgestomet (Crestar; Intervet México SA), colocados subcutáneamente en el pabellón auricular y mantenidos por nueve días; al retirar los implantes, cada oveja recibió intramuscularmente (IM) 150 UI de gonadotropina coriónica equina (Folligon, Intervet SA, México).

La detección del estro inició 24 h después de retirar los implantes, dos veces al día (06:00 - 07:00 y 17:00 - 18:00 h), utilizando machos enteros provistos de mandil. Las ovejas que presentaron celo franco fueron asignadas aleatoriamente a uno de tres tratamientos grupo testigo) Las ovejas (GT; n = 14) recibieron 1.5 ml de agua estéril (IM) una vez al día (06:00 h); grupo 2) Las ovejas fueron tratadas (IM) con una dosis total por día (06:00 h) de 2.2 mg kg de pv^{-1} de flunixin meglumine (FM-1; n = 14) y grupo 3). Las ovejas fueron tratadas IM con una dosis de 4.4 mg kg de pv^{-1} FM (n = 15), distribuido en dos aplicaciones (00:06 y 18:00 h), todos los tratamientos se administraron durante ocho días a partir del día 11 del estro (estro = día 0).

La detección del celo se realizó dos veces al día (06:00-07:00 y 17:00 -18:00 h) iniciando del día 12 y hasta día 25 post-estro, utilizando machos enteros provistos de mandil.

Adicionalmente, en un grupo de 23 ovejas (8 GT, 7 FM-1 y 8 FM-2) se colectaron muestras de sangre de la vena yugular en tubos con anticoagulante (EDTA 10 %) para cuantificar la concentración de progesterona, iniciando el día del estro y a intervalo de tres días hasta el día 15, a partir del cual las muestras se tomaron diariamente hasta que la oveja presentó nuevamente actividad estral o hasta el día 23.

Las muestras sanguíneas fueron centrifugadas a 1500 g por 15 min para la separación del plasma, que fue almacenado a -20 °C hasta la determinación de la hormona, mediante radioinmunoensayo de fase sólida (Coat-A-Count Procedure, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, Ca. 90045.). El ensayo fue altamente específico para progesterona, con 0.2 % de reacción cruzada con la 20 α -dihidroprogesterona y 3.4 % con la 17 α -hidroxiprogestero; el límite de detección fue 0.03 ng ml⁻¹. El coeficiente de variación intraensayo e interensayo fue 6 % y 9.5 %, respectivamente.

Las variables de respuesta consideradas en este estudio fueron: tasa de retorno al estro, el intervalo entre estros (longitud del ciclo estral) y la longitud de la fase lútea. Se consideró el inicio de la fase lútea cuando la concentración de progesterona fue mayor de 1 ng ml⁻¹, y el final cuando la concen-

tración fue menor de 1 ng ml⁻¹. La frecuencia de animales que retornó al estro entre grupos después del tratamiento se comparó a través de una prueba de χ^2 (Steel RGD, Torrie JH 1985. Bioestadística. Principios y procedimientos. McGraw-Hill. México DF). Para evaluar las diferencias en el intervalo entre estros y la duración de la fase lútea, se utilizó un diseño completamente al azar, considerando como fuente de variación el efecto del tratamiento. La comparación entre las medias se realizó mediante la prueba de Tukey, con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$. La prueba de normalidad de los datos para la duración del ciclo estral y de la fase lútea se corroboró mediante la prueba de Shapiro-Wilks, para muestras pequeñas. Todos los análisis estadísticos se hicieron mediante el procedimiento de modelos lineales generales (SAS 2000. SAS Institute Inc.V 9.0).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tasa de retorno al estro (Tabla 1) no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$) entre tratamientos; sin embargo, las ovejas del grupo FM-2 presentaron un mayor intervalo entre estros comparado con los grupos GT y FM1 (ANDEVA $F = 10.26$; $p = 0.023$).

La duración de la fase lútea, fue mayor (ANDEVA $F = 8.45$; $p = 0.034$) con la administración de FM dos veces al día que en el GT y el FM-1, en los cuales se observó una diferencia de 4.25 y 2.71 menos que en el grupo FM-2 (Tabla 2).

Algunos autores, han demostrado que el flunixin meglumine inhibe eficazmente la secreción pulsátil de la PGF_{2 α} en las vacas (Odensvick K 1995. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 18:254-259; Binelli M, Machado R, Bergamaschi MACM, Bertan CM 2009. Animal Reproduction 6: 125-134 y en ovejas (Aiumlamai S, Fredriksson G, Uggla A, Kindahl H, Edqvist LE 1990. Zentralblatt für Veterinärmedizin 37:23-34) lo que evita la lisis del cuerpo lúteo, modificando la longitud del ciclo estral.

En cuanto a la falta de respuesta del grupo FM-1, es probable que este esquema de aplicación no haya sido suficiente para inhibir la producción de

la PGF_{2 α} (Zarco L, Stabenfeldt GH, Basu S, Bradford GE, Kindahl H 1988. Journal of Reproduction and Fertility 83:527-536; Odensvick K 1995. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 18:254-259), especialmente porque la vida media del antiinflamatorio se encuentra entre 5.7-6.2 h (Welsh EM, McKellar QA, Nolan AM 1993. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 16:181-188) lo que posiblemente permitió la síntesis y liberación de la PGF_{2 α} con la subsecuente destrucción del cuerpo lúteo y, por tanto, que la longitud del ciclo estral no se afectara de manera significativa.

El incremento en la longitud del ciclo estral obtenida en este estudio con la aplicación del FM dos veces al día (FM-2) difiere de lo reportado en un estudio previo (Miguelajáuregui GME 1993. Efecto de la inhibina o flunixin-meglumine sobre la luteólisis en ovejas. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México DF), donde ovejas Suffolk, Dorset y Tabasco tratadas con 2.2 mg kg⁻¹ FM dos veces al día, no mostraron diferencias en la longitud del ciclo estral (17.0 ± 0.4 d) en comparación con el grupo testigo (17.6 ± 1.5 d).

El incremento en la longitud del ciclo estral registrado en este estudio con la aplicación de FM dos veces al día, fue similar a lo observado en otros estudios (Lassoued N, Khaldi G, Chemineau P, Cognié Y, Thimonier J 1997. Reproduction Nutrition Development 37:559-571), donde se demostró que la aplicación de FM en ovejas, a intervalos de 12 h, disminuyó de manera significativa la producción de 13-14-dihidro-15-ceto-prostaglandin F_{2 α} , principal metabolito en la degradación de la PF_{2 α} y cuya concentración es directamente proporcional a la concentración del agente luteolítico.

En otros estudios, se ha utilizado el líquido folicular equino (Hernández CJ, Murcia MC, Valencia MJ, Rojas MS, Zárate MJ, Zarco QL 1997. Veterinaria México 28:117-121), como una alternativa para suprimir la producción de la PGF_{2 α} , con la diferencia de que éste último lo realiza a través de un bloqueo sobre el desarrollo folicular y de la producción de estradiol (Henderson et al., 1986; Baird et al., 1991). Otros estudios (Hernández CJ, Balcázar A, Valencia J, Zarco L 1996. XX Congreso Nacional

Tabla 1. Número y porcentaje de ovejas Pelibuey tratadas con flunixin meglumine que retornaron al estro e intervalo entre estros (media \pm ee).

Table 1. Number and percentage of Pelibuey ewes treated with flunixin meglumine that returned to the oestrus and the interval between estrus (mean \pm se).

Tratamiento	N	Ovejas que retornaron al estro	Intervalo entre estro (d)
GT	14	13 (92 %) ^a	17.23 \pm 0.47 ^a
FM-1	14	13 (92 %) ^a	18.76 \pm 0.47 ^a
FM-2	15	13 (87 %) ^a	20.53 \pm 0.47 ^b

^{a,b}, Diferente literal en la misma columna indica diferencia significativa ($p < 0.05$).

GT = grupo testigo; FM-1 = 2.2 mg kg⁻¹ d⁻¹ FM-2 = 4.4 mg kg⁻¹ dos veces d⁻¹.

de Buiatría. Agosto 14-17; Acapulco (Guerrero) México. Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, A.C) encontraron que las ovejas tratadas con líquido folicular equino (LFE) presentaron un ciclo estral más largo ($p < 0.05$) en comparación con las ovejas del grupo testigo (19.5 ± 0.66 vs 17.7 ± 0.26 días, respectivamente). En otro estudio en donde se aplicó LFE a ovejas con estro inducido con PGF_{2 α} (Hernández CJ, Murcia MC, Valencia MJ, Rojas MS, Zárate MJ, Zarco QL 1997. Veterinaria México 28:117-121), también se observó alargamiento en la presentación del estro, que en promedio, fue mayor en 1.3 días ($p < 0.05$), comparado con el promedio de las ovejas del grupo testigo. En relación a la duración de la fase lútea, en las ovejas del presente estudio, el comportamiento fue similar a lo observado con el intervalo entre estros; es decir, se presentó un alargamiento en su longitud en el grupo FM, encontrándose mayor diferencia ($p < 0.05$), cuando se aplicó dos veces al día.

Los resultados de este estudio difieren de lo reportado en un trabajo previo (Miguelajáuregui GME 1993. Efecto de la inhibina o flunixin-meglumine (Finadine) sobre la luteólisis en ovejas. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México DF), donde se encontraron diferencias en la duración de la fase lútea entre el grupo testigo y el grupo tratado con Finadine. La explicación en las diferencias encontradas en los resultados de este estudio y los resultados descritos, es en parte, la misma que se mencionó en relación con el intervalo entre estros, ya que en principio, la duración de la fase lútea determina la duración del intervalo entre estros

de los animales (Henderson KM, Prisk MD, Hudson N, Ball K, McNatty KP, Heath D, Kieboom LE, McDiarmid J 1986. Journal of Reproduction and Fertility 76:623-635; Fields MJ, Fields PA 1993. Proceedings for Annual Meeting Society for Theriogenology; 1993 August 12-14; Jacksonville Florida USA. Society for Theriogenology: 107-116; Niswender GD, Nett TM 1994. The corpus luteum and its control. En Infraprimate species. Knobil E, Neill JD, (ed). The physiology of reproduction. Raven Press. New York USA).

En otro estudio (Lau TM, Kerton DJ, Gow CB, Fairclough RJ 1993. Journal of Reproduction and Fertility 98:229-233), al igual que en el presente estudio, se evidenció que la aplicación de FM provocó en ovejas una extensión de la fase lútea hasta el día 17 del ciclo estral, registrando concentraciones de P₄ superiores a 6.36 nmol ml⁻¹, mientras que en las ovejas del grupo control la concentración de la hormona apenas fue detectable hacia el día 11 del ciclo estral.

El incremento en la duración de la fase lútea encontrado en las ovejas en este estudio con la aplicación del Flunixin Meglumine dos veces al día, es similar al que se observó previamente (Hernández CJ, Zarco QL, Kindahl H, Valencia MJ 2006. Veterinaria México 35:55-64) quienes al aplicar líquido folicular equino encontraron que la fase lútea presentó una mayor duración (13.5 ± 0.53 d) que en aquellas ovejas a las que no fueron tratadas (12.2 ± 0.32 d), lo que representó un incremento de cerca de 1.1 d en la longitud de la fase lútea ($p < 0.05$). Un aspecto importante encontrado en el presente estudio, fue la diferencia en la longitud de la fase lútea entre el grupo de ovejas FM-2 y el grupo

Tabla 2. Duración de la fase lútea (media \pm ee) en las ovejas Pelibuey tratadas con flunixin meglumine.

Table 2. Luteal phase length (mean \pm se) in the Pelibuey ewes treated with flunixin meglumine.

Tratamiento	N	Duración de la fase lútea (d)
GT	8	11.75 \pm 0.51 ^a
FM-1	7	13.29 \pm 0.55 ^a
FM-2	8	16.00 \pm 0.51 ^b

^{a,b}, Diferente literal en la misma columna indica diferencia significativa ($p < 0.05$).

GT = grupo testigo; FM-1 = 2.2 mg kg⁻¹ d⁻¹ FM-2 = 4.4 mg kg⁻¹ dos veces d⁻¹.

testigo fue, en promedio, de 4.25 días.

En conclusión, el tratamiento con flunixin meglumine dos veces al día, fue efectivo para incrementar la longitud del ciclo estral y fase lútea de las ovejas Pelibuey.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo brindado para realizar los estudios de doctorado (Registro No. 122100), así como al Laboratorio Schering Plough por la donación del flunixin meglumine utilizado en el estudio.