



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E PRODUÇÃO
ANIMAL NA AMAZÔNIA**

GLÁUCIA MOTA BRAGANÇA

**DIAGNÓSTICO PRECOCE DE GESTAÇÃO EM VACAS ZEBUÍNAS PELA
DETECÇÃO DE GLICOPROTEÍNAS ASSOCIADAS À PREENHEZ**

Belém, 2012



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E PRODUÇÃO
ANIMAL NA AMAZÔNIA

GLÁUCIA MOTA BRAGANÇA

**DIAGNÓSTICO PRECOCE DE GESTAÇÃO EM VACAS ZEBUÍNAS PELA
DETECÇÃO DE GLICOPROTEÍNAS ASSOCIADAS À PREENHEZ**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia para obtenção do título de Mestre

Área de concentração: **Produção Animal**

Orientador: **Prof. Dr. Rinaldo B. Viana**

Belém, 2012



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E PRODUÇÃO
ANIMAL NA AMAZÔNIA

GLÁUCIA MOTA BRAGANÇA

**DIAGNÓSTICO PRECOCE DE GESTAÇÃO EM VACAS ZEBUÍNAS PELA
DETECÇÃO DE GLICOPROTEÍNAS ASSOCIADAS À PREENHEZ**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia para obtenção do título de Mestre

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rinaldo Batista Viana – Orientador
Universidade Federal Rural da Amazônia

Prof. Dr. Otávio Mithio Ohashi – 1º Examinador
Universidade Federal do Pará

Profa. Dra. Luciara Celi da Silva Chaves – 2º Examinadora
Universidade Federal Rural da Amazônia

Prof. Dr. Moisés dos Santos Miranda – 3º Examinador
Universidade Federal do Pará

*“O temor do **Senhor** é o princípio do conhecimento, mas os
loucos desprezam a sabedoria e a instrução.”
(Provérbios, 1:7).*

*À Deus, por ter me capacitado e até aqui ter me ajudado.
À Lucas & Dora, meus pais, pelo amor e fundamental apoio.
Dedico*

AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa não teria sido possível sem o trabalho, esforços, e colaboração de muitas pessoas. Portanto, gostaria de agradecer:

*Especialmente, ao meu orientador **Professor Rinaldo B. Viana**, pelo apoio incondicional, pelos valiosos conselhos, pelas críticas sempre construtivas e pela confiança em mim depositada ao longo desses dois anos. A ele, minha profunda gratidão e admiração pela inesgotável energia com que conduz seus trabalhos diante das múltiplas funções que exerce na Universidade Federal Rural da Amazônia.*

*A **IDEXX Laboratories**, que fomentou o desenvolvimento desta pesquisa.*

*Ao **Professor Luiz Fernando Rodrigues**, pela grande colaboração na concessão de parte dos equipamentos utilizados neste trabalho.*

*Ao **Prof. Dr. Cláudio Cabral Campello**, pela obsequiosidade e importante contribuição.*

*Ao **Instituto Evandro Chagas**, em especial ao pessoal da Seção de Meio Ambiente, **Dr^a. Iracina de Jesus**, **Dr^a. Maria de Fátima Assis** e **Msc. Renato Medeiros**, pela presteza em nos ajudar na execução deste estudo.*

*Aos proprietários da **Fazenda Xingu**, **Srs. Gustavo e Luis**; bem como ao gerente **Sr. Erandir** e aos **Médicos Veterinários Adriel e Fúvio Florenzano Picanço** pela inestimável contribuição.*

*Ao Grupo de Pesquisa em Andrologia, Inseminação Artificial, Sanidade e Melhoramento Genético de Bovinos e Bubalinos (**Gaia**) e ao **PETVet**, pelo esforço e ajuda no árduo trabalho da fazenda, e pelas longas horas processando e identificando as amostras.*

*Ao **Zootecnista Waldjânio Melo**, meu amigo de pós-graduação e companheiro ao longo desta jornada.*

*Ao **Professor Frederico Ozanan**, Coordenador do Programa de Pós-graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia, pela dedicação a este curso e disposição em ajudar aos pós-graduandos.*

*Aos **colegas, professores e funcionários** do Programa de Pós-graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia da Universidade Federal Rural da Amazônia.*

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Ilustração esquemática da placenta bovina. (A) Placenta mostrando migração das células binucleadas em direção ao trofotoderma para fundir o epitélio caruncular (1 e 2) e formar células trinucleadas (3, 4, 5), com posterior (3) exocitose. (B) Parte de um placentônio mostrando a penetração das vilosidades cotiledonares fetais nas criptas carunculares materna. Adaptado de Wooding (1992). **18**
- Figura 2** Filograma baseado na sequência de aminoácidos mostrando o relacionamento entre as PAG bovinas e o reconhecimento dessas PAG por anticorpos monoclonais. Green et al. (2005). **20**
- Figura 3** Variação da expressão de diferentes PAG ao longo da prenhez em bovinos. Adaptado de Green et al. (2000). **21**
- Figura 4** Protocolo utilizado para indução do estro, sincronização da ovulação e inseminação artificial em tempo fixo utilizado nos animais do experimento. **43**
- Figura 5** Ilustração esquemática do desenho experimental desenvolvido no presente estudo. **44**
- Figura 6** Distribuição dos controles e amostras na placa. Tiras 1 e 7: A e B, controles negativos; C e D, controles positivos. **45**
- Figura 7** Incubação a 37 °C (60min). **45**
- Figura 8** Etapa de lavagem. **46**
- Figura 9** Etapa de pipetagem com solução detectora. **46**
- Figura 10** Teste ELISA mostrando a coloração azul das amostras reagentes a PAG na etapa pós-incubação com solução substrato TMB. Belém-Pará, 2012. **47**
- Figura 11** Teste ELISA mostrando o resultado final, onde a coloração amarela das amostras indica a presença de PAG (prenhe) e a coloração translúcida, ausência de PAG (não prenhe). Belém-Pará, 2012. **48**
- Figura 12** Images ultrassonográficas caracterizando prenhez em vaca. (A) 25° dia de gestação, pequeno acúmulo de líquido no lume uterino. (B) 28° dia de gestação, visualização do líquido amniótico, porém embrião não visível no interior do saco gestacional. Belém-Pará, 2012. **49**

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Sequência N-terminal de algumas das principais PAG identificadas.	19
Quadro 2	Fórmulas utilizadas para calcular o diagnóstico da prenhez e interpretação dos resultados.	48
Quadro 3	Vantagens e dificuldades dos métodos ELISA-PAG, ultrassonografia e palpação retal para o diagnóstico da gestação.	60
Quadro 4	Custo do teste de detecção de PAG nos EUA.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Resultados positivos corretos, falsos positivos, resultados negativos corretos, falsos negativos, sensibilidade (%), especificidade (%), valor preditivo positivo (%) e valor preditivo negativo (%) para o diagnóstico precoce da gestação em vacas zebuínas utilizando-se os métodos ELISA-PAG e ultrasonografia.	51
Tabela 2	Sensibilidade (%) obtida para o diagnóstico precoce da gestação em vacas zebuínas utilizando-se os métodos ELISA-PAG e ultrasonografia.	52
Tabela 3	Especificidade (%) obtida para o diagnóstico precoce da gestação em vacas zebuínas utilizando-se os métodos ELISA-PAG e ultrasonografia.	55
Tabela 4	Valor preditivo positivo (%) obtida para o diagnóstico precoce da gestação em vacas zebuínas utilizando-se os métodos ELISA-PAG e ultrasonografia.	57
Tabela 5	Valor preditivo negativo (%) obtida para o diagnóstico precoce da gestação em vacas zebuínas utilizando-se os métodos ELISA-PAG e ultrasonografia.	58
Tabela 6	Simulação dos custos do diagnóstico de gestação por palpação retal, ultrasonografia e ELISA-PAG para um rebanho de 1.000 vacas de corte.	62

SUMÁRIO

	RESUMO	
	ABSTRACT	
	PARTE 1	13
1	CONTEXTUALIZAÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1	GLICOPROTEÍNAS ASSOCIADAS À PREENHEZ	17
2.2	DIAGNÓSTICO PRECOCE DE GESTAÇÃO EM VACAS	22
	REFERÊNCIAS	30
	PARTE 2	38
	Diagnóstico precoce da gestação em vacas zebuínas utilizando a detecção de glicoproteínas associadas à prenhez	39
1	Introdução	40
2	Material e método	42
2.1	Local de estudo	42
2.2	Desenho experimental	43
2.3	Colheita de sangue e processamento das amostras	43
2.4	Determinação de PAG	44
2.5	Exames ultrassonográficos	49
2.6	Palpação retal	50
2.7	Análise estatística	50
3	Resultados e discussão	50
3.1	Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da ultrassonografia e do ELISA-PAG	51
3.2	Relação benefício-custo dos métodos de detecção de PAG, ultrassonografia e palpação retal.	59
5	Conclusão	63
	Referências	

RESUMO

BRAGANÇA, G.M. **Diagnóstico precoce de gestação em vacas zebuínas pela detecção de glicoproteínas associadas à prenhez.** 66f. Dissertação – Programa de Pós-graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia. Universidade Federal Rural da Amazônia, Pará. 2012.

As glicoproteínas associadas à prenhez são substâncias expressas na placenta de mamíferos ungulados. Em ruminantes, essas proteínas são secretadas continuamente desde a implantação embrionária até o parto. Recentemente, estas proteínas tem sido correlacionadas e utilizadas para o diagnóstico precoce da gestação em bovinos. Assim, objetivou-se com este estudo avaliar um teste ELISA-PAG que utiliza a detecção de glicoproteínas para o diagnóstico precoce de gestação em vacas zebuínas de corte, determinando a acurácia do método aos 25 e 28 dias após inseminação artificial em tempo fixo, comparando-o com a utilização da ultrassonografia no mesmo período. O estudo foi conduzido em uma fazenda situada na mesorregião do Nordeste Paraense, no qual se utilizou 130 fêmeas mestiças da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), saudáveis e submetidas a um protocolo hormonal para inseminação artificial em tempo fixo. Ao 25º e 28º dia pós-inseminação, foram realizados exames ultrassonográficos e coletas de sangue para determinação das glicoproteínas associadas à prenhez. As amostras de sangue foram centrifugadas, e os soros sanguíneos foram alíquotados e acondicionados a -20 °C para posterior determinação das glicoproteínas associadas à prenhez, utilizando um ELISA comercial conforme orientações do fabricante. Os testes foram realizados no Laboratório de Virologia da Seção de Meio Ambiente do Instituto Evandro Chagas. Os resultados da densidade óptica de leitura foram usados para validar o teste em que as amostras com resultados ≥ 0.300 foram consideradas positivas (prenhe) e aquelas com resultados < 0.300 , negativas (não prenhe). Também foi feita avaliação visual da placa pela cor (poços com solução amarela, positivo; poços com solução translúcida, negativo). Os resultados verificados foram classificados como diagnóstico positivo correto (a), diagnóstico positivo incorreto (b), diagnóstico negativo correto (c), diagnóstico negativo incorreto (d). A partir desses valores foram calculados de cada método a sensibilidade ($100 \times a/a + d$), a especificidade ($100 \times c/c + b$), o valor preditivo positivo ($100 \times a/a + b$) e o valor preditivo negativo ($100 \times c/c + d$). O teste do Qui-quadrado foi utilizado para comparar as sensibilidades e especificidades dos dois métodos de diagnóstico de gestação (ELISA-PAG e ultrassonografia). Diferenças entre vacas prenhes e não prenhes para o ELISA-PAG foram analisadas usando o test-t Student's. A acurácia do ELISA-PAG foi igual ao 25º e 28º dia pós-inseminação, com sensibilidade de 100%, especificidade 92,86%, valor preditivo positivo 96,70% e valor preditivo negativo 100%. Todavia, a ultrassonografia aos 25º e 28º dias, respectivamente, apresentou sensibilidades de 62,50% e 93,18% ($p < 0,05$), especificidades de 95,24% e 95,24%, valores preditivos positivos de 96,49% e 97,63%, e valores preditivos negativos de 54,79% e 86,96% ($p < 0,05$). Houve diferenças significativas entre o ELISA-PAG e ultrassonografia em relação as sensibilidades e valores preditivos negativos, porém os exames foram equivalentes em especificidades e valores preditivos positivos. Conclui-se que o teste ELISA-PAG demonstrou-se mais sensível e tão específico quanto à ultrassonografia no período estudado, com alta precisão especialmente na identificação de fêmeas não gestantes, podendo ser utilizado com segurança a partir do 25º dia após a IATF para obtenção precoce do diagnóstico de prenhez em fêmeas zebuínas.

Palavras-chave: Reprodução, Bovinos, PAG, ELISA

ABSTRACT

BRAGANÇA, G.M. **Early pregnancy diagnosis in zebu cows by detection of pregnancy-associated glycoproteins.** 66f. Dissertation - Postgraduate Program in Animal Health and Production in the Amazon. Federal Rural University of Amazonia, Para. 2012.

Pregnancy-associated glycoproteins (PAG) are substances expressed in the placenta of ungulate mammals. In ruminants, these proteins are secreted continuously from the embryonic implantation until the delivery. Recently, these proteins have been correlated and used for early pregnancy diagnosis in cattle. Thus, the objective of this study was to evaluate a PAG-ELISA for early pregnancy diagnosis in zebu beef cows, determining the accuracy of the method on the 25th and 28th days after a fixed time artificial insemination, comparing it with the use of ultrasound in the same period. The study was conducted on a farm located in the Northeast region of Pará State, in which 130 healthy Nelore (*Bos taurus indicus*) females were used and subjected to a hormonal protocol for fixed time artificial insemination. On the 25th and 28th days post-insemination, ultrasound examinations were performed and blood samples for the determination of PAG were collected. Blood samples were centrifuged, and the serum sample were aliquoted and stored at -20°C for later analysis of pregnancy associated glycoproteins, using a commercial ELISA in accordance with the manufacturer's guidelines. The tests were performed at the Laboratory of Virology of the Environment Section of Instituto Evandro Chagas. The results of the reading optical density were used to validate the test in which the results of samples were considered positive when ≥ 0.300 (pregnant) and were negative when < 0.300 (non pregnant). The visual assessment of the plate is in accordance with the color (yellow solution wells, positive; wells with translucent solution, negative) was also performed. The results of transrectal ultrasonography and PAG-ELISA were arranged as follows: correct positive diagnosis (a), incorrect positive diagnosis (b), correct negative diagnosis (c), and incorrect negative diagnosis (d). From these values the sensitivity ($100 \times a/a + d$), the specificity ($100 \times c/c + b$), the positive predictive value ($100 \times a/a + b$) and the negative predictive value ($100 \times c/c + d$) of each test were calculated. The Chi-square test was used to compare the sensitivities and specificities of the two pregnancy tests (ultrasound x PAG-ELISA). Differences between pregnant and non-pregnant cows in the PAG-ELISA were statistically analyzed by using a Student's t-test. The accuracy of PAG-ELISA was equal on 25th and 28th days post fixed timed artificial insemination with sensitivity 100%, specificity 92,86%, positive predictive value 96,70% and negative predictive value 100%. However, the ultrasound scanning on 25th and 28th days, respectively, showed sensitivity 62,50% and 93,18% ($p < 0,05$), specificity 95,24% and 95,24%, positive predictive value 96,49% and 97,63%, and negative predictive value 54,79% and 86,96% ($p < 0,05$). There were significant differences between PAG-ELISA and ultrasound on the sensitivities and negative predictive value. However, the tests were equivalent in specificity and positive predictive values. In conclusion, the PAG-ELISA proved to be more sensitive and as specific as the ultrasound during the study period, with high accuracy on the identification of non pregnant and can be safely used from the 25th day after fixed timed artificial insemination for obtaining early pregnancy diagnosis in Zebu females.

Keywords: Reproduction, Cattle, PAG, ELISA



PARTE 1

1 CONTEXTUALIZAÇÃO

O efetivo bovino brasileiro em 2010 (209,541 milhões de cabeça) teve acréscimo de 2,1% em relação a 2009, cujo maior índice de aumento foi registrado na Região Norte (4,1%), contribuindo para que o Brasil se torne o segundo maior produtor e líder mundial em exportação de carne bovina. Assim, a pecuária brasileira desponta com grande destaque no cenário internacional da produção de commodities (IBGE, 2011).

Neste cenário promissor da pecuária de corte nacional, tem se destacado como cluster de produção, o Estado do Pará, com um rebanho bovino de 18.225.808, responsável por 96% das exportações brasileira de bovinos vivos. O Estado, também possui características naturais de interesses econômicos relevantes como extensas áreas produtivas, que algumas vezes são subutilizadas e porto estratégico para o escoamento da produção (FUNDEPEC, 2011).

Frente à crescente demanda pelo aumento da produtividade, Ferraz et al. (2008) e Gottschall et al. (2008) mencionaram a utilização de biotécnicas aplicadas à reprodução como uma alternativa para o aumento dos índices reprodutivos dos plantéis, destacando-se entre elas a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), que visa sincronizar a ovulação, possibilitando a inseminação em dia e horário pré-determinados, eliminando a necessidade da detecção do estro e concentrando as parições no início da estação reprodutiva, favorecendo a concepção na estação de monta subsequente.

Associado à utilização de biotécnicas, o diagnóstico precoce da gestação é uma valiosa técnica para o incremento da eficiência reprodutiva, pois possibilita tanto a adoção de um manejo adequado das fêmeas prenhes, quanto à recincronização e acasalamento ou reinseminação de fêmeas não gestantes o mais precocemente possível (GRADELA et al., 2009; GREEN et al., 2011), proporcionando a redução do intervalo entre partos, a identificação de vacas inférteis, permitindo o tratamento ou seu descarte (JAINUDEEN; HAFEZ, 2004), visto que vacas improdutivas (inférteis ou subférteis) mantidas no rebanho representam prejuízos em qualquer sistema de produção de bovinos (WHITLOCK; MAXWELL, 2008).

Assim, pode-se afirmar que muitos são os benefícios aquinhoados por um diagnóstico precoce de gestação, executado de forma precisa, sem risco para a fêmea e para o concepto. Alguns métodos de diagnóstico de gestação em vacas, tais como a palpação e a ultrassonografia transretal, dependem da detecção do concepto-feto, membranas fetais e líquidos fetais (JAINUDEEN; HAFEZ, 2004). O exame sonográfico uterino é a técnica mais

utilizada para o diagnóstico precoce de gestação e demonstra melhor acurácia após 30 dias de prenhez (FRICKE, 2002; DESCÔTEAUX et al., 2009).

Técnicas imunológicas como radioimunoensaio (RIA) (AYAD et al., 2009; BORBATO et al., 2009) e ensaio imunoenzimático (ELISA) (PIECHOTTA et al., 2011; ABDULKAREEM et al., 2012) também tem sido descritas em estudos para diagnóstico precoce de gestação em ruminantes. Recentemente, Lucy et al. (2011) descreveram algumas alternativas viáveis de diagnóstico da gestação em vacas, cujos fundamentos se baseiam na detecção ou mensuração dos níveis de substâncias produzidas nos ovários, útero ou concepto que penetram no sangue, urina ou leite materno, tais como progesterona, fator precoce da gestação, interferons e glicoproteínas associadas à gestação.

Dentre essas substâncias, as glicoproteínas associadas à prenhez (pregnancy-associated glycoprotein - PAG) têm sido descritas como um bom marcador da gestação e da viabilidade fetal, com concentrações em ascensão no sangue materno a partir do 22º dia até a última semana de gestação, e podem ser dosadas com segurança por meio de testes ELISA por volta do 28º dia após a inseminação (GREEN et al., 2005; ROMANO; LARSON, 2010; ABDULKAREEM et al., 2012).

As PAG são em alguns aspectos semelhantes à gonadotrofina coriônica humana (hCG), hormônio base do teste de gestação em humanos. Ambas, hCG e PAG, são glicoproteínas placentárias com meia-vida longa e podem ser prontamente mensuradas em amostras de sangue. No entanto, as duas proteínas têm estruturas moleculares e funções completamente diferentes, e a PAG, ao contrário da hCG, não pode ser detectada na urina (LUCY et al., 2011).

Além da precocidade do diagnóstico, outra vantagem da utilização de PAG como marcador de prenhez está relacionada ao alto valor preditivo negativo dos testes comerciais. Isso significa que uma vaca diagnosticada negativa, definitivamente não estará prenhe (LUCY et al., 2011). Embora, existam testes mais precoces que a determinação de PAG, como a dosagem de progesterona, a viabilidade econômica do PAG-ELISA mostrou-se menos onerosa (US\$ 2,40) do que a dosagem de progesterona (US\$ 2,48) e palpação retal (US\$ 8-10) (ABDULKAREEM et al., 2011).

Além de bovinos, existem na literatura alguns estudos sobre as PAG, desenvolvidos em outras espécies de ruminantes: ovinos (KAREN et al., 2006), caprinos (HAUGEJORDEN et al., 2006), bisons (KIEWISZ et al., 2009), lhamas e alpacas (MAJEWSKA et al., 2011), e bubalinos (ABDULKAREEM et al., 2012). Todavia os testes realizados em bovinos foram

conduzidos em países europeus e norte-americanos, e todos, utilizando animais de raças taurinas, principalmente vacas leiteiras da raça Holstein e seus mestiços.

A literatura demonstra, portanto uma lacuna de estudos sobre a detecção de PAG no diagnóstico precoce da prenhez em bovinos de raças zebuínas, à exceção do estudo de Sousa (2002) realizado em zebuínos da raça “Azawak du Niger”. Outros estudos para detecção de PAG em bovinos de corte existem, mas também foram desenvolvidos em bovinos mestiços de raças taurinas (GREEN et al., 2009). No Brasil, há apenas um estudo que avaliou PAG durante a gestação de ruminantes, o qual foi conduzido em cabras das raças Moxotó e Canindé (SOUSA et al., 1999).

Destarte, diante das considerações expostas optou-se por verificar a eficiência de um teste ELISA-PAG para diagnóstico precoce da gestação em bovinos zebuínos de corte, objetivando:

- 1) Verificar a viabilidade de um teste ELISA-PAG para o diagnóstico precoce de gestação em vacas zebuínas de corte.
- 2) Determinar a sensibilidade e especificidade de um teste ELISA-PAG para o diagnóstico precoce de gestação em vacas zebuínas de corte aos 25 e 28 dias após IATF.
- 3) Comparar a eficácia do ELISA-PAG para o diagnóstico precoce de gestação em bovinos de corte frente à utilização da ultrassonografia aos 25 e 28 dias pós-IATF.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 GLICOPROTEÍNAS ASSOCIADAS À PRENHEZ

As glicoproteínas associadas à prenhez (PAG) são proteínas expressas na placenta de mamíferos ungulados da ordem Artiodactyla (WOODING et al., 2005; SPENCER et al., 2007). Essas proteínas placentárias pertencem a uma família multigênica (GREEN et al., 2005) integrante do grupo das proteases aspárticas (XIE et al., 1991). Algumas PAG não são proteases funcionais, ou seja, são incapazes de agirem como enzimas cataliticamente ativas, contudo desempenham função de peptídeos de ligação com especificidades na interface fetomaternal. O arranjo molecular sugere que isso, provavelmente ocorra devido à substituição de alguns aminoácidos em regiões críticas de seus sítios catalíticos (XIE et al., 1995; GURUPRASAD et al., 1996; GREEN et al., 1998; TELUGO et al., 2009).

As PAG foram descobertas por Butler et al. (1982) e são também conhecidas como proteína-B específica da gestação (pregnancy specific protein - PSPB) (SASSER et al., 1989) proteína sérica da gestação (pregnancy-serum protein 60kDa - PSP60), bPAG (ZOLI et al., 1992ab), boPAG-1 (XIE et al., 1991) ou antígeno SBU3 (SBU3 antigen) (WOODING et al., 1994). Segundo Sasser et al. (2009) as sequências de nucleotídeos que codificam para uma forma de PSPB e PAG-1 mostraram que PAG-1 é homólogo a uma das variantes de PSPB. Assim, do ponto de vista bioquímico, PSPB é a mesma coisa que boPAG-1 (GREEN et al., 2005).

Nos ruminantes, as PAG são produzidas, primariamente por células binucleadas trofoblásticas (CBN) que surgem na trofoderme por cariocinese das células mononucleadas coriônicas, a partir do período de implantação embrionária e migram em direção ao epitélio uterino ao longo de toda a gestação (Figura 1). Essa migração pode resultar na formação de células trinucleadas de vida curta. As PAG, bem como outras substâncias produzidas pelas CBN são armazenadas em grânulos densos no interior do citoplasma e são liberadas no organismo materno após a exocitose (WOODING, 1992; WOODING et al., 2005; SPENCER et al., 2007; WOODING; BURTON, 2008).

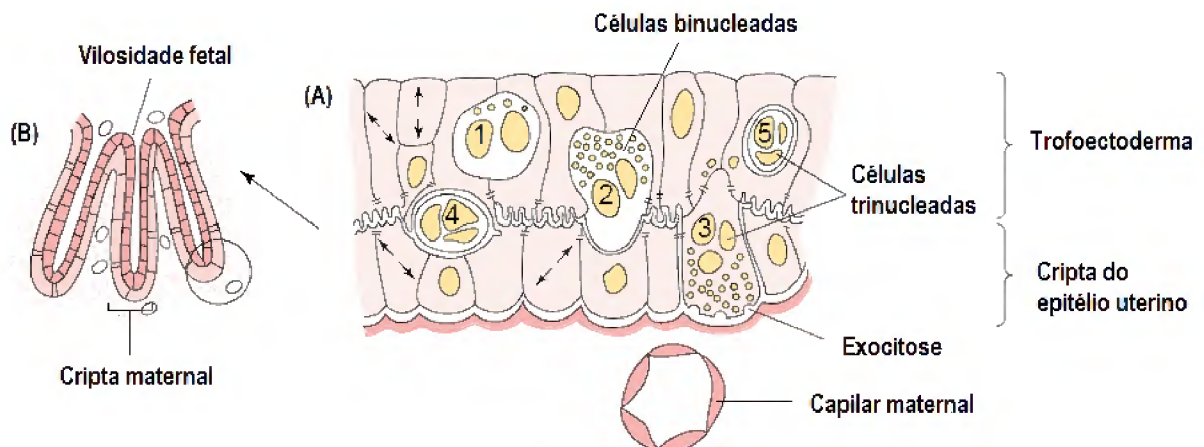


Figura 1. Ilustração esquemática da placenta bovina. (A) Placenta mostrando migração das células binucleadas em direção ao trofotoderma para fundir o epitélio caruncular (1 e 2) e formar células trinucleadas (3, 4, 5) com posterior (3) exocitose. (B) Parte de um placentônio mostrando a penetração das vilosidades cotiledonares fetais nas criptas carunculares maternas. (Diagrama adaptado de Wooding, 1992).

Até o presente momento, pelo menos 22 tipos de cDNA codificantes para diferentes PAG bovinas já foram identificadas e classificadas em duas categorias. A categoria de PAG tipo 1 (boPAG-1, -3, -15...), é a mais extensa e considera-se que do ponto de vista evolutivo, resultou de uma série mais recente de duplicação gênica. Essa categoria de PAG é expressa por células binucleadas, sendo exclusiva de ruminantes, e a única passível de dosagem na circulação periférica materna. Ao contrário, a categoria de PAG tipo 2 (boPAG-2, -12, -15...) é menor, com aproximadamente 7 cDNA dos 22 tipos conhecidos, são expressas difusamente no trofotoderma da placenta de todos os artiodáctilos e especula-se que tenha se originado de uma série antiga de duplicação gênica (GREEN et al., 2000; GREEN et al., 2005; GARBAYO et al., 2008). Cálculos de curva de calibração baseados nas diferenças sequenciais de nucleotídeos, estimaram cerca de 56 ± 6 milhões de anos de diferença entre as duas categorias de PAG (HUGHES et al., 2000).

Uma nova PAG bovina foi identificada por Garbayo et al. (2008) com sequência de nucleotídeos que difere em poucos aminoácidos da boPAG-2 descrita por Xie et al. (1994), sendo a nova PAG denominada boPAG-22 e adicionada a categoria de PAG tipo 2.

A categoria de PAG tipo 1 tem similar, se não idêntico, amino-terminal na sequência de aminoácidos (Quadro 1); este fundamento foi utilizado para verificar quais moléculas PAG eram mais reconhecidas por cada um dos anticorpos monoclonais (L4, J2 e A6) e qual a

relação delas com outras PAG bovinas (Figura 2). A partir disso foi desenvolvido uma técnica de ELISA sanduíche para diagnosticar a gestação em fêmeas bovinas (GREEN et al., 2005).

Quadro 1. Sequência N-terminal de algumas das principais formas de PAG já identificadas.

Proteína	Código de acesso	Sequência N-terminal																			
boPAG-1	Q29432	R	G	S	N	L	T	T	H	P	L	R	N	I	K	D	L	V	Y	M	G
boPAG-2	Q28057	N	D	S	K	I	T	I	H	P	L	R	N	Y	L	D	T	A	Y	V	G
boPAG-4	O46492	R	G	S	N	L	T	I	H	P	L	R	N	I	R	D	F	F	Y	M	G
boPAG-5	O46493	R	G	S	N	I	T	I	H	P	L	R	N	I	M	D	M	V	Y	M	G
boPAG-6	O46494	R	G	S	N	L	T		H	P	L	R	N	I	R	D	L	F	Y	M	G
boPAG-7	O46495	R	G	S	N	L	T	I	H	P	L	R	N	I	R	D	I	F	Y	M	G
boPAG-8	O46496	P	D	K	K	F	S	S	H	Q	L	K	N	F	Q	N	A	V	Y	F	G
boPAG-9	O46497	R	G	S	N	L	T	I	H	P	L	R	N	I	M	N	L	V	Y	M	G
boPAG-10	O46498	D	Q	N	I	I	Y	H	H	P	L	R	S	Y	K	D	F	S	Y	I	G
boPAG-11	O46499	S	D	P	K	L	S	T	H	P	L	R	N	A	L	D	M	A	Y	V	G
boPAG-12	O46500	K	D	S	K	I	T	I	H	P	L	K	N	Y	L	D	M	A	Y	M	G
boPAG-13	Q9TTW1	N	D	S	K	I	T	I	H	P	L	R	N	Y	L	D	T	A	Y	V	G
boPAG-14	Q9TTW0	R	G	S	N	L	T	T	H	P	L	M	N	I	W	D	L	L	Y	L	G
boPAG-15	Q9TTV9	H	G	S	N	L	T	I	H	P	L	R	N	I	R	D	L	F	Y	M	G
boPAG-16	Q9TTV8	R	G	S	N	L	T	T	L	P	L	R	N	I	R	D	M	L	Y	V	G
boPAG-17	Q9TTV7	R	G	S	N	L	T	I	H	P	L	R	N	I	M	D	M	L	Y	V	G
boPAG-18	Q9TTV6	C	G	S	N	L	T	F	H	P	L	R	N	I	K	D	R	L	Y	V	G
boPAG-19	Q9TTV5	R	G	S	N	L	T	S	H	P	L	R	N	I	K	D	L	V	Y	L	A
boPAG-20	Q9TTV4	R	G	S	N	L	T	T	H	P	L	R	N	I	W	D	I	F	Y	I	G
boPAG-21	Q9TTV3	R	G	S	N	L	T	T	L	P	L	R	N	I	E	D	L	M	Y	V	G

Fonte: Sousa, 2002.

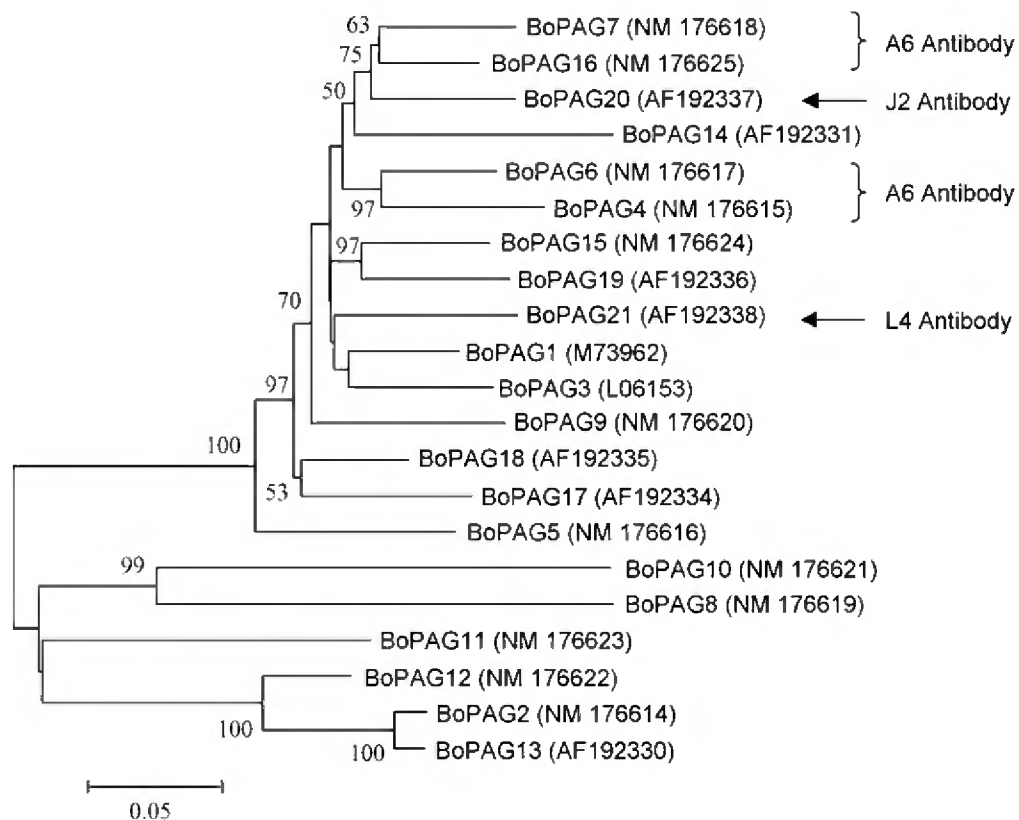


Figura 2. Filograma baseado na sequência de aminoácidos mostrando o relacionamento entre as PAG bovinas e o reconhecimento delas por anticorpos monoclonais. Green et al. (2005).

Apesar de sua alta expressão na placenta bovina e espécies afins, as funções das PAG ainda permanecem desconhecidas. A categoria de PAG tipo 2, devido sua localização (entre o trofoectoderma e o epitélio uterino), supõe-se que pode desempenhar um papel na placentogênese. Por outro lado, a categoria de PAG tipo 1, liberada no organismo materno, também pode ser encontrada depositada na camada de estroma no interior das carúnculas, sendo sugestivo de que funcione como barreira física e ou imunológica para a proteção do concepto (WOODING et al., 2005).

Outro indício de que a categoria PAG-1 possa desempenhar função imunomodulatória foi aventado em um estudo onde, vacas com alto níveis plasmáticos de PAG (> 900 ng/mL) tiveram maior contagem de leucócitos totais e de neutrófilos entre os dias 262-268 de gestação (ABDELFATAH-HASSAN et al., 2012). Embora, as PAG sejam expressas ao longo de todo o período gestacional existe uma variação na expressão dessas proteínas, de forma que algumas delas são encontradas durante toda a prenhez como boPAG-8, -10, e -11; porém outras são observadas somente em determinados períodos, a exemplo da boPAG-9 (Figura 3) (GREEN et al., 2000).

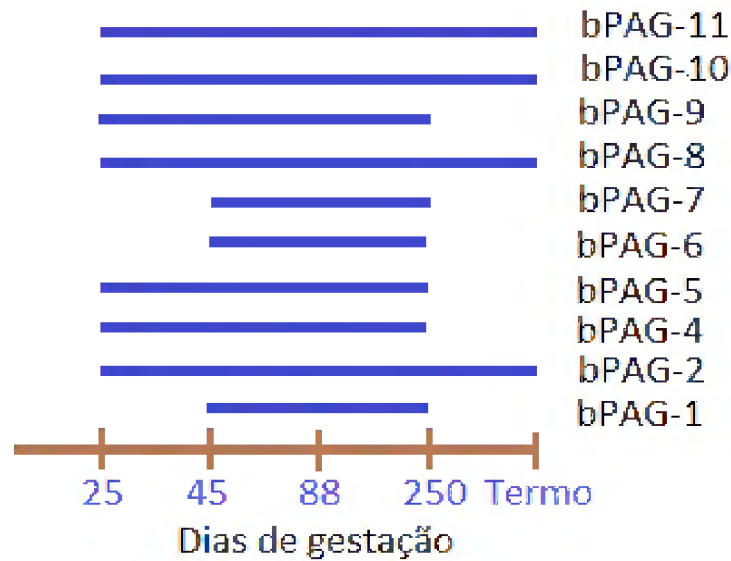


Figura 3. Variação da expressão de diferentes PAG ao longo da prenhez em bovinos. Adaptado de Green et al. (2000).

Concentrações de boPAG-1 são mensuráveis na circulação materna em bovinos a partir do 22º dia do período gestacional, contudo para fins de diagnóstico de gestação oferece maior segurança após o 28º dia (GREEN et al., 2005). Além do período gestacional, outros fatores como espécie (HAUGEJORDEN et al., 2006; GARBAYO et al., 2008), número de fetos (PATEL et al., 1997; ANDREU-VÁZQUEZ et al., 2011) e diferentes sistemas radioimunológicos (AYAD, et al., 2009) influenciam nas concentrações dessas proteínas.

2.2 DIAGNÓSTICO PRECOCE DE GESTAÇÃO EM VACAS

O diagnóstico precoce da gestação é importante para a intensificação do manejo reprodutivo, especialmente na bovinocultura de corte, onde a renda está diretamente ligada ao número de animais vendidos e, conseqüentemente ao número de parições por ano (WHITLOCK; MAXWELL, 2008). Assim, a finalidade do diagnóstico precoce de gestação consiste na identificação de fêmeas não prenhes o mais precocemente possível, sobretudo quando protocolos para sincronização do estro com inseminação artificial em tempo fixo ou transferência de embriões são utilizados. Nestes casos, os animais podem ser submetidos a novos protocolos de ressincronização (GRADELA et al., 2009; CONSTANT et al., 2011; GREEN et al., 2011), promovendo uma redução do intervalo entre partos, aumentando a produtividade e como consequência a lucratividade da atividade pecuária (JAINUDEEN; HAFEZ, 2004).

Entre as técnicas que permitem o diagnóstico precoce da gestação em bovinos destacam-se a palpação retal (ROMANO et al., 2007) e a ultrassonografia (GRADELA et al., 2009; SILVA et al., 2009) que dependem da detecção do concepto-feto e membranas e líquidos fetais (JAINUDEEN; HAFEZ, 2004), e mais recentemente a detecção de substâncias produzidas pelos ovários, útero ou concepto através de técnicas imunológicas (RIA e ELISA) (JAINUDEEN; HAFEZ, 2004). Dentre essas substâncias, as PAG tem sido descritas como um bom marcador de gestação, devido sua expressão ser mais estável ao longo do período gestacional, que outras substâncias como o fator precoce da gestação, interferons e progesterona (LUCY et al., 2011).

A palpação retal é um procedimento, frequentemente utilizado por médicos veterinários para o diagnóstico da prenhez em vacas e búfalas, realizado geralmente entre 40° e 45° dia após o acasalamento ou inseminação artificial, podendo ser executada para diagnóstico precoce, em um limite mínimo de segurança entre 30° e 35° dias de gestação (ROMANO et al., 2007; LUCY et al., 2011).

A acurácia da palpação retal para o diagnóstico precoce de prenhez foi avaliada em 168 búfalas, entre o 31° e 55° dia após o acasalamento. A sensibilidade da palpação foi de 37,5% entre 31°-35° dia, aumentando para 93,8% entre o 46°-50° dia, chegando a 100% nos 51°-55° dias ($P < 0,01$). A especificidade deste método variou entre 90,9% e 100% entre o 31°-

55°. A palpação retal demonstrou-se um método preciso quando o diagnóstico é realizado a partir dos 46 dias de gestação (KAREN et al., 2011).

Porém a utilização da palpação retal para o diagnóstico precoce da gestação em bovinos poderia proporcionar o aumento do risco de danos ao concepto. Embora, no estudo de Romano et al. (2007) ao avaliarem o efeito da palpação retal sobre a viabilidade embrionária e fetal em vacas leiteiras, utilizando a técnica de deslizamento da membrana fetal, os autores tenham observado não haver diferenças significativas ($P > 0,20$) na taxa de morte embrionária e fetal entre os grupos palpados (14,7%) e não palpados (13,4%), da perda embrionária entre palpados (9,3%) e não palpados (10,7%), bem como de óbitos fetais entre palpados (5,9%) e não palpados (3,0%), concluíram que a taxa geral de morte embrionária (30-45 dias) de 10% foi significativamente maior ($P < 0,001$) que a de morte fetal (46-60 dias) de 4,5%.

A ultrassonografia é uma técnica de grande importância não somente para o diagnóstico e caracterização do estágio gestacional - desenvolvimento embrionário e fetoplacentário (BARROS; VISINTIN, 2001; CHAVATTE-PALMER et al., 2006; FERREIRA et al., 2011), mas também tem ótima aplicabilidade na utilização de biotécnicas destinadas à reprodução (BARBOSA et al., 2011; GREEN et al., 2011). Porém o exame ultrassonográfico necessita ser realizado com muito critério e conhecimento das estruturas a serem visualizadas em cada fase gestacional (BARROS; VISINTIN, 2001).

DesCôteaux et al. (2009) relataram que o diagnóstico precoce da gestação em vacas por meio da ultrassonografia é uma técnica rápida e segura a partir do 27° dia após inseminação. A partir do 26° dia de gestação é possível visualizar o lume uterino contendo uma quantidade variável de líquido anecóico produzido pelo concepto. No entanto, antes do 27° ou 28° dia pode não haver líquido suficiente no lume uterino para confirmar o diagnóstico de gestação. Assim a visualização do embrião no líquido amniótico pode ser adiada até o 28°-30° da prenhez, pois o embrião pode ficar escondido atrás de dobras endometriais. Ao 30° dia o âmnio já é visto como um envelope altamente ecogênico. No entanto, a acurácia de exames ultrassonográficos antes dos 30 dias de gestação, é igual a somente 62% para os diagnósticos positivos e 66% para os negativos (KASTELIC et al., 1988).

Para a espécie bubalina, a visualização da vesícula gestacional é possível entre $20,55 \pm 2,34$ dias. O embrião propriamente dito dentro da vesícula gestacional e seus batimentos cardíacos são detectáveis no $25,18 \pm 1,91$ e $25,27 \pm 3,58$ dias de gestação, respectivamente. A coluna de líquido no corno contralateral pode ser visualizada aos $31,0 \pm 3,83$ dias de gestação e a vesícula amniótica aos $31,64 \pm 2,34$ dias de gestação. A vesícula gestacional inicialmente

exibe uma forma esférica com limites distintos mostrando uma superfície levemente irregular no interior. Desde o 25º dia de gestação algumas protuberâncias endometriais são observadas como um sinal precoce de segmentação uterina, porém se torna evidente ao 36º dia, alcançando a magnitude máxima entre o 67º-70º dias da prenhez (FERREIRA et al., 2011).

Real et al. (2006) ao compararem a ultrassonografia e a palpação retal para o diagnóstico precoce de gestação em vacas leiteiras entre 20-40 dias pós-serviço observaram baixas sensibilidade e especificidade para os períodos entre 20-25 dias (50% e 69%, respectivamente) e entre 26-30 dias (79% e 89%, respectivamente); já entre 31-35 dias a ultrassonografia foi capaz de detectar 98% de vacas prenhes, confirmadas posteriormente por palpação retal, cuja especificidade foi de 80%. Os melhores resultados foram obtidos entre os 36-40 dias com sensibilidade igual a 97%, especificidade 93%, valor preditivo positivo 93% e valor preditivo negativo 97%.

O exame sonográfico no diagnóstico precoce de gestação em vacas (24º-30º dia) e novilhas (21º-27º) pós-inseminação, demonstrou que nas vacas a sensibilidade do método aumentou gradual e significativamente ($P < 0,01$) do 24º dia (74,5%) ao 29º dia (100%). No mesmo intervalo, a especificidade aumentou de 86,9% para 97,4%, respectivamente. O valor preditivo positivo variou de 77,8% ao 24º dia para 91,9% ao 30º dia; já o valor preditivo negativo foi igual a 88% ao 24º dia e 100% ao 29º dia. Em novilhas, aos 21 dias pós-inseminação os valores para sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo foram iguais a 50,0%, 87,5%, 80,0% e 63,6%, respectivamente, passando a valores iguais a 100,0% (26º dia), 96,7% (26º dia), 95,6% (24º dia) e 100% (26º dia), respectivamente. A sensibilidade foi significativamente maior ($P < 0,05$) em novilhas (96,8%) do que em vacas (89,2%) entre o 24º-27º dia pós-inseminação, sendo a máxima sensibilidade, assim como, o máximo valor preditivo negativo obtidos três dias mais cedo nas novilhas (26º dia) do que nas vacas (29º dia) (ROMANO et al., 2006).

Além da palpação retal e da ultrassonografia, testes imunológicos tem sido desenvolvidos para melhorar a eficácia do diagnóstico precoce de gestação em ruminantes (BUTLER et al., 1982; SASSER et al., 1989; GREEN et al., 2005). Nos últimos 30 anos pesquisas com identificação, isolamento e caracterização de PAG subsidiaram trabalhos de purificação e dosagens radioimunológicas (RIA) (SASSER et al., 1989; ZOLI et al., 1992ab; TELUGO et al., 2009), o que proporcionou estudos do perfil de PAG durante a gestação e pós-parto (SOUSA, 2002), além da aplicabilidade da dosagem de PAG no diagnóstico

precoce de gestação em diferentes espécies de ruminantes (GREEN et al., 2000; KAREN et al., 2003; PATEL et al., 2004; GARBAYO et al., 2008; BORBATO et al., 2009).

A partir do trabalho realizado por Sasser et al. (1989) várias técnicas de RIA passaram a ser desenvolvidas para detecção de glicoproteínas associadas a gestação. Entretanto, a precisão do diagnóstico em animais não gestantes era limitada, devido à meia-vida relativamente longa das PAG no período pós-parto e pós-mortalidade embrionária, com ocorrência de falsos positivos (SZENCI et al., 1998).

O perfil de PAG aferido a partir da 8ª semana de gestação em vacas zebuínas demonstrou um aumento progressivo nas concentrações de PAG da 8ª à 35ª semana de prenhez ($6,0 \pm 4,2$ a $196,0 \pm 34,8$ ng/mL). Em seguida, essas concentrações permanecem relativamente constantes até a 39ª semana ($210,8 \pm 74,8$ ng/mL), alcançando os mais altos níveis ($1.095,6 \pm 607,8$ ng/mL) na semana do parto (40ª semana). A meia-vida da PAG verificada neste estudo através de RIA foi cerca de 10,1 dias, sendo necessárias até 14 semanas pós-parto para que as concentrações de PAG se tornassem indetectáveis (SOUSA, 2002).

Uma técnica de ELISA sanduíche para determinação de PAG, que empregou anticorpos monoclonais (L4, J2, A6), antisoro policlonal de coelho, e fosfatase alcalina conjugada ao anticorpo anti-IgG de coelho, foi utilizada para acompanhar o perfil de PAG no soro sanguíneo de 42 vacas e novilhas de raça taurina durante a gestação e pós-parto. No estudo observou-se que a partir do 22º dia de prenhez foi possível a detecção de PAG, porém a imunorreatividade dessas proteínas elevou-se rapidamente entre o 24º-28º dia, com concentrações médias de $8,75 \pm 3,04$ ng/mL ao 28º dia e pico de concentração iguais a $588,9 \pm 249,9$ ng/mL na última semana de gestação. Observou-se ainda que na 8ª semana pós-parto não foi detectada PAG em 38 de 42 vacas e na 10ª semana pós-parto os níveis de PAG tornaram-se indetectáveis em todas as vacas, com meia-vida de 4,3 dias (GREEN et al., 2005).

A eficiência de um teste ELISA-PAG no diagnóstico precoce de prenhez foi avaliada em vacas e novilhas de raças taurinas leiteiras, entre o 25º-45º dia, e taurina de corte entre o 29º-56º dia pós-inseminação. A sensibilidade ($99,8 \pm 0,2\%$), especificidade ($91,7 \pm 1,4\%$) e o valor preditivo negativo ($99,7 \pm 0,3\%$) para o teste de detecção de PAG em bovinos leiteiros foram semelhantes nas diferentes raças entre vacas e novilhas. O valor preditivo positivo para o teste foi maior nas novilhas do que nas vacas leiteiras ($96,5 \pm 1,4\%$ vs $90,5 \pm 1,7\%$, respectivamente). Em bovinos de corte a sensibilidade (100%), especificidade ($92,3 \pm 3,0\%$),

valores preditivos positivo ($95,0 \pm 2,0\%$) e negativo (100%) foram iguais entre vacas e novilhas, assim como a acurácia do teste não foi diferente entre bovinos de leite e corte. Os autores concluíram que a determinação de PAG por ELISA demonstrou-se altamente sensível e específica para o diagnóstico da gestação precoce em bovinos (GREEN et al., 2009).

Em um experimento cujo objetivo era determinar a acurácia de um teste ELISA comercial¹, 246 vacas foram submetidas à ultrassonografia ao 28º dia e 46,3% (114/246) delas foram diagnosticadas prenhes. Ao 35º dia apenas 106 vacas continuavam gestantes, indicando segundo os autores, 7% de perdas embrionárias. O teste ELISA apresentou sensibilidade de 93,9%, especificidade de 95% e os valores preditivos positivo e negativo iguais a 94,7%, não havendo diferença significativa entre as variáveis aos 28 e 35 dias pós-inseminação. Do mesmo modo, a acurácia do teste ELISA de 94,7% não foi significativamente diferente ao 28º, 30º e 35º dia pós-inseminação artificial. De acordo com os autores, os falsos negativos foram devido à baixa concentração de PAG na vaca prenhe e os falsos positivos devido à persistência de concentrações de PAG nas vacas que sofreram perda gestacional (ROMANO; LARSON, 2010).

Outro estudo realizado com 197 vacas leiteiras da raça Holsten-Friesian, entre 26-58 dias pós-IA, comparou dois ELISAs, um comercial¹ e outro imunométrico, previamente descrito por Wooding (1992) que utilizou antisoro policlonal (anti-PAG-IgG) de coelho para ligação específica com PAG. Ambos os ELISAs tiveram altas e similares sensibilidade e especificidade para diagnosticar a gestação quando comparados ao ultrassom, de modo que, para o ELISA comercial¹ e o imunométrico os resultados foram respectivamente, sensibilidades (98,0% e 97,8%), especificidades (97,1% e 91,2%), valor preditivo positivo (99,3% e 97,8%), valor preditivo negativo (91,7% e 91,2%), e acurácias iguais a 97,8% e 96,4% ($P > 0,05$) (PIECHOTTA et al., 2011).

Em um rebanho de vacas leiteiras, um estudo para diagnosticar precocemente a gestação e prever perdas embrionárias, foi realizado entre o 30º-36º dia pós-inseminação artificial utilizando-se um teste ELISA comercial¹ para determinação de PAG, associada à mensuração da concentração de progesterona no soro materno. As vacas foram submetidas à palpação retal aos 60 dias após a inseminação para confirmação do diagnóstico. Durante o estudo 50,3% das vacas foram diagnosticadas prenhes ao ELISA-PAG, porém a palpação retal revelou 17,4% de perdas gestacionais. Foi observado que as perdas embrionárias ocorreram quando a densidade óptica (DO) de leitura da amostra estava entre 0-30% acima do

¹bioPryn® Pregnancy Test

DO cut-off durante o 30º-36º dia de gestação. Utilizando este critério, 31,8% de perdas embrionárias tardias foram corretamente previstas. Todavia, conseguiu-se prever perdas embrionárias com melhor acurácia (92%) quando além da DO entre 0-30% (entre 30º-36º dia) acima da DO cut-off, também era observada a baixa concentração de progesterona ($< 2,0$ ng / mL) (GABOR et al., 2008).

Além de bovinos (PIECHOTTA et al., 2011) a determinação de PAG para o diagnóstico precoce da gestação tem sido utilizada em ovinos (KAREN et al., 2006), caprinos (HAUGEJORDEN et al., 2006), bisons (KIEWISZ et al., 2009), lhamas e alpacas (MAJEWSKA; et al. 2011) e bubalinos (ABDULKAREEM et al., 2012).

El-Battawy et al. (2009) avaliaram a dosagem de PAG no primeiro trimestre da gestação em búfalas, observando uma concentração de PAG no 28º dia pós-acasalamento igual a $4,48 \pm 0,92$ ng/mL. Posteriormente, a concentração de PAG aumentou significativamente ($p < 0,05$) no 41º dia ($27,27 \pm 6,74$ ng/mL), atingindo o mais alto nível no 50º dia ($28,25 \pm 6,78$ ng/mL).

Utilizando 275 búfalas, Karen et al. (2007) comparou a ultrassonografia transretal a um teste PAG-RIA para o diagnóstico precoce de gestação. Uma baixa sensibilidade da ultrassonografia entre o 19º-24º dia após inseminação artificial foi observada, aumentando continuamente até chegar 100% entre o 31º-35º dia. Já a especificidade da ultrassonografia foi relativamente alta e constante entre o 19º-35º dia e chegou a 100% entre 36º-40º dia de gestação. A sensibilidade do teste PAG-RIA também foi baixa entre os dias 19º-24º pós-inseminação artificial, atingindo os 100% entre o 31º-35º dia, porém a especificidade foi alta e constante ($> 90\%$). O nível de PAG em búfalas prenhes foi significativamente maior ($P < 0,0001$) do que nas vazias em todo o período da pesquisa. Observaram-se sete falsos negativos e oito falsos positivos à ultrassonografia aos 19º-55º dias pós-inseminação artificial. Já para o teste PAG-RIA ocorreram 11 falsos negativos e 12 falsos positivos no mesmo período.

Em um estudo recentemente desenvolvido por Abdulkareem et al. (2011) um ELISA comercial¹ foi utilizado no diagnóstico precoce da gestação de búfalas, comparando-o à dosagem de progesterona no soro sanguíneo e à palpação retal. O ELISA comercial demonstrou maior acurácia na detecção precoce do estágio gestacional de búfalas gestantes e não gestantes entre os dias 22-24 pós-acasalamento (sensibilidade 88,88%; especificidade 76,92%; valor preditivo positivo 72,72%; e valor preditivo negativo 90,91%) com menos falsos positivos e falsos negativos quando comparado a dosagem de progesterona

(sensibilidade 66,67%; especificidade 53,85%; valor preditivo positivo 50%; e valor preditivo negativo 70%) no mesmo período. O ELISA entre 22-24 dias também teve melhor resultado que a palpação entre 42-44 dias pós-serviço (sensibilidade 55,55%; especificidade 80%; valor preditivo positivo 71,43%; e valor preditivo negativo 66,66%).

Em cabras leiteras, um estudo comparou cinco tipos diferentes de radioimunoensaio (RIA 1, 2, 3, 4 e 5) para o diagnóstico precoce da gestação, de modo que, os diferentes tipos de PAG (12.5 µg) foram marcados radioativamente pelo método da lactoperoxidase descrito por Thorell et al. (1971). Os resultados obtidos demonstraram uma sensibilidade > 90% no dia 21 da gestação pelos RIA tipo 2, 3, 4 e 5, porém o RIA tipo 1 somente chegou a este percentual no 28º dia. A especificidade para os RIA 2, 3, 4 e 5 foram cerca de 99% ao 21º dia, porém a RIA 1 chegou a esta especificidade somente a partir do 23º dia da prenhez. A acurácia do teste foi > 95% para os RIAs 2, 3 e 4 no dia 21 e para o RIA 5 no dia 22. No entanto para o RIA 1 permaneceu < 95% no 28º dia (GONZÁLEZ et al., 1999).

O perfil de PAG em cabras das raças Moxotó e Canindé no Nordeste do Brasil demonstrou que a média semanal da concentração de PAG variou significativamente entre os animais ($p < 0,0001$) e os períodos de prenhez ($p < 0,0001$), todavia não foram afetados pela raça. Um efeito significante ($p < 0,05$) do número de fetos sobre a concentração de PAG também foi encontrado, onde a média de concentração de PAG em animais gestantes de fetos múltiplos foi maior ($106,34 \pm 7,94$ ng/mL) do que naquelas prenhes de feto único ($71,8 \pm 6,50$ ng/mL) (SOUSA et al., 1999).

A comparação da análise de progesterona, detecção de PAG e exame ultrassográfico transretal no diagnóstico precoce de gestação em cabras, revelou que tanto o exame sonográfico quanto a determinação de PAG no plasma fornecem diagnósticos muito precisos ao 26 dia após acasalamento, com acurácias de 99,4% para ultrassonografia e 100% para detecção de PAG. A dosagem de progesterona demonstrou-se mais precoce no diagnóstico de gestação, sendo capaz de identificar 100% de cabras prenhes ao 22º dia, no entanto apresentou falha no diagnóstico de cabras não gestantes, identificando apenas 42 de 64 fêmeas não prenhes, com obtenção de diagnósticos falsos positivos, determinando uma acurácia do teste de progesterona de 82,8% no período (GONZÁLEZ et al., 2004).

Em ovelhas a concentração de PAG foi mensurada utilizando-se dois distintos métodos de RIA, cujo RIA-706 foi descrito detalhadamente por Perenyi et al. (2002) e novo sistema RIA-Pool que utilizou uma mistura de quatro diferentes anti-soros policlonais produzido em coelhos. Ao 18º dia a presença de PAG foi detectada em 60,5% (26/43) das

ovelhas pelo método RIA-706 e em 95,3% (41/4) pelo método RIA-Pool. A partir do 24º dia por ambos os métodos foi possível verificar a presença de PAG em todas as ovelhas prenhes (BORBATO et al., 2009).

Além do diagnóstico precoce de gestação a mensuração de PAG também tem sido empregada na investigação de perdas embrionárias e fetais, pois mesmo possuindo meia vida relativamente longa, essas proteínas placentárias apresentam decréscimo em seus níveis pós perda gestacional, sendo possível a detecção da perda quando observa-se redução dos níveis de PAG em dosagens subsequentes (LÓPEZ-GATIUS et al., 2007; GABOR et al., 2008).

REFERÊNCIAS

ABDELFATAH-HASSAN, A.; ALMERÍA, S.; SERRANO, B.; SOUSA, N.M.; BECKERS, J.F.; LÓPEZ-GATIUS. The inseminating bull and plasma pregnancy-associated glycoprotein (PAG) levels were related to peripheral leukocyte counts during the late pregnancy/early postpartum period in high-producing Dairy cows. *Theriogenology*. In Press, Available online 5 January 2012.

ABDULKAREEM, T.A.; SHARIFI, A.I.; ISHAK, M.A.; EIDAN, S.M.; ALNIMR, M.A.; PASSAVANT, C.W.; BRANEN, J.R.; SASSER, R.G. Early pregnancy detection of iraqi riverine buffalo (*Bubalus bubalis*) using the BioPRYN enzyme-linked immunosorbent assay for PSPB and the progesterone assay. *Reproduction in Domestic Animals*, v.46, p.455–462, 2011.

ABDULKAREEMA, T.A.; EIDANA, S.M.; ISHAKA, M.A.; AL-SHARIFIB, S.A.M.; ALNIMER, M.A.; PASSAVANT, C.W.; BRANEN, J.R.; SASSER, R.G. Pregnancy-specific protein B (PSPB), progesterone and some biochemical attributes concentrations in the fetal fluids and serum and its relationship with fetal and placental characteristics of Iraqi riverine buffalo (*Bubalus bubalis*). *Animal Reproduction Science*, v.130, p.33– 41, 2012.

ANDREU-VÁZQUEZ, C.; GARCIA-ISPIERTO, I.; LÓPEZ-BÉJER, M.; SOUSA, N.M.; BECKERS, J.F.; LÓPEZ-GATIUS, F. Clinical implications of induced twin reduction in dairy cattle. *Theriogenology*, v.76, p.512–521, 2011.

AYAD, A.; SOUSA, N.M.; SULON, J.; HORNICK, J.L.; IGUER-OUADA, M.; BECKERS, J.F. Correlation of five radioimmunoassay systems for measurement of bovine plasma pregnancy-associated glycoprotein concentrations at early pregnancy period. *Research in Veterinary Science*, v.86, p.377–382, 2009.

BARROS, B.J.P.; VISINTIN, J.A. Controle ultra-sonográfico de gestações, de mortalidades embrionárias e fetais e do sexo de fetos bovinos zebuínos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.38, n.2, p. 74-79, 2001.

BORBATO, O.; SOUSA, N.M.; DEBENEDETTI.; CANALI, C.; TODINI, J.F.; BECKERS, J.F. Validation of a new pregnancy-associated glycoprotein radioimmunoassay method for the detection of early pregnancy in ewes. *Theriogenology*, v.72, p.993–1000, 2009.

BUTLER, J.E.; HAMILTON, W. C.; SASSER. R. E.; RUDER, C. A.; HASS, G. M.; WILLIAMS, R. J. Detection and partial characterization of two bovine pregnancy-specific proteins. *Biology of Reproduction*, v.26, p.925-933, 1982.

CHAVATTE-PALMER, P.; SOUSA, N.; LAIGRE, P.; CAMOUS, S.; PONTER, A.A.; BECKERS, J.F.; HEYMAN, Y. Ultrassound fetal measurements and pregnancy associated glycoprotein secretion in early pregnancy in cattle recipients carrying somatic clones. *Theriogenology*, v.66, p.829-840, 2006.

CONSTANT, F.; CAMOU, S.; CHAVATTE-PALMER, P.; HEYMAN, Y.; SOUSA, N.; RICHARD, C.; BECKERS, J.F.; GUILLMOT, M. Altered secretion of pregnancy-associated glycoproteins during gestation in bovine somatic clones. *Theriogenology*, v.76, p.1006–1021, 2011.

DESCÔTEAUX, L.; GNEMMI, G.; COLLOTON, C. Ultrasonography of bovine female genital tract. *Veterinary Clinics Food Animal*, v.25, p.733-752, 2009.

EL-BATTAWY, K.A.; SOUSA, N.M.; SZENCI, O.; BECKERS, J.F. Pregnancy-associated glycoprotein profile during the first trimester of pregnancy in egyptian buffalo cows. *Reproduction in Domestic Animals*, v.44, p.161-166, 2009.

FERRAZ, H.T.; VIU, M.A.O.; LOPES, D.T. Sincronização da ovulação para realização da inseminação artificial em tempo fixo em bovinos de corte. *Pubvet*, v.2, n.12, p.18-24, 2008.

FERREIRA, P.C.J.; MARTIN, I.; IKIKURA, C.R.; GIMENES, L.U.; FUJIHARA, C.J.; JORGE, A.M.; OBA, E.; Ultrasonographic monitoring of early pregnancy development in Murrah buffalo heifers (*Bubalus bubalis*). *Livestock Science*, v.138, p.174–179, 2011.

FRICKE, P.M. Scanning the Future: Ultrasonography as a Reproductive Management Tool for Dairy Cattle. *Journal Dairy Scienci*, v. 85, p.1918–1926, 2002.

FUNDO DE DESENVOLVIMENTO DA PECUÁRIA DO ESTADO DO PARÁ – FUNDEPEC. Índices Pecuários do Estado do Pará, 2011.

GABOR, G.; TOTH, F.; ABONYI-TOTH, Z.; SASSER, R. Factors influencing pregnancy rate and late embryonic loss in dairy cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, v.43, p.53-58, 2008.

GARBAYO, J.M.; SERRANO, B.; LOPEZ-GATIUS, F. Identification of novel pregnancy-associated glycoproteins (PAG) expressed by the peri-implantation conceptus of domestic ruminants. *Animal Reproduction Science*, v.103, p.120 –134, 2008.

GOTTSCHALL, C.S.; MARQUES, P.R.; CANELLAS, L.C.; ALMEIDA, M.R. Aspectos relacionados à sincronização do estro e ovulação em bovinos de corte. *A Hora Veterinária*, v.164, p.43-48, 2008.

GONZÁLEZ, J.; SULON, J.M.; GARBAYO, M.; BATISTA, F.; CABRERA, P.; CALERO, A.; GARCIA, A. Early pregnancy diagnosis in goats by determination of pregnancy-associated glycoprotein concentrations in plasma samples. *Theriogenology*, v.52, n.4, p.717-725, 1999.

GONZÁLEZ, F.; CABRERA, F.; BATISTA, M.; RODRÍGUEZ, N.; LAMO, D. A.; SULON, J.; BECKERS, J.F.; GARCIA, A.A. Comparison of diagnosis of pregnancy in the goat via transrectal ultrasound scanning, progesterone, and pregnancy-associated glycoprotein assays. *Theriogenology*, v.62, p.1108–1115, 2004.

GRADELA, A.; DANIEL, T.; CARNEIRO, T.; VALIN, D. Exatidão da ultra-sonografia para diagnóstico de gestação aos 28 dias após inseminação e sua contribuição na eficiência

reprodutiva em fêmeas Nelore e cruzadas. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v.104, p.31-35, 2009.

GRANADOS, L.B.C.; DIAS, A.J.B.; SALES, M.P. Aspectos gerais da reprodução de caprinos e ovinos. 1º ed. Campos dos Goytacazes – Projeto PROEX/UENF, 2006.

GREEN, J.A.; XIE, S.; ROBERTS, R.M. Pepsin-related molecules secreted by trophoblast. *Rev Reprod.* 3:62-69, 1998.

GREEN, J. A.; XIE, S.; QUAN, X.; BAO, B.; GAN, X.; MATHIALAGAN, N. Pregnancy-associated glycoproteins bovine and ovine glycoproteins exhibit spatially and temporally distinct expression patterns during pregnancy. *Biology of Reproduction*, v.62, p.1624–1631, 2000.

GREEN, J.A.; PARKS, T.E.; AVALLE, M.P.; TELUGU, B.P.; MCLAIN, A.L.; PETERSON, A.J.; MCMILLAN, W.; MATHIALAGAN, N.; HOOK, R.R.; XIE, S.; ROBERTS, R.M. The establishment of an ELISA for the detection of pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) in the serum of pregnant cows and heifers. *Theriogenology*, v.63, p.1481–1503, 2005.

GREEN, J.C.; VOLKMANN, D.H.; POOCK, S.E.; McGRATH, M.F.; EHRHADT, M.; MOSELEY, A.E.; LUCY, M.C. Technical note: A rapid enzyme-linked immunosorbent assay blood test for pregnancy in dairy and beef cattle. *Journal of Dairy Science*, v.92, n.8, p.3819–3824, 2009.

GREEN, J.A.; NEWSOM, E.M.; LUCY, M.C. Incorporation of a rapid pregnancy-associated glycoprotein ELISA into a CIDR-Ovsynch resynchronization program for a 28 day re-insemination interval. *Theriogenology*, v.75, p.320-328, 2011.

GRUNERT, E.; BIRGEL, E.H.; VALE, W.G. Patologia e clínica da reprodução dos animais mamíferos domésticos: ginecologia. São Paulo: Editora Varela, 2005.

GURUPRASAD, K.; BLUNDELL, T.L.; XIE, S.; GREEN, J.; SZAFRANSKA, B.; NAGEL, R.J.; McDOWELL, K.; BAKER, C.B.; ROBERTS, R.M. Comparative modeling and analysis of amino acid substitutions suggests that the family of pregnancy-associated glycoproteins includes both active and inactive aspartic proteinases. *Protein Engineering*. v.9, n.10, p.849-856, 1996.

HAUGEJORDEN, G.; WAAGE, S.; DAHL, E.; KARLBERG, K.; BECKERS, J.F.; ROPST, E. Pregnancy associated glycoproteins (PAG) in postpartum cows, ewes, goats and their offspring. *Theriogenology*, v.66, p.1976–1984, 2006.

HUGHES, A.L.; GREEN, J.A.; GARBAYO, J.M.; ROBERTS, R.M. Adaptive diversification within a large family of recently duplicated placentally-expressed genes. *Proceedings of National Academy of Sciences of USA*, v.97, n.7, p.3319-3323, 2000.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE, 2011. Produção da Pecuária Municipal 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/ppm2010.pdf> Acesso em: 08 de março de 2012.

JAINUDEEN, M.R.; HAFEZ, E.S.E. Diagnóstico da gestação. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S. E. Reprodução Animal. São Paulo: Editora Manole, 7ed, p.399-408, 2004.

KASTELIC, J.P.; CURRAN, S.; PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Ultrasonic evaluation of the bovine conceptus. *Theriogenology*, v.29, n.1, p.39-54, 1988.

KAREN, A.; BECKERS, J.F.;SULON, J.; SOUSA, N.M.; SZABADOS, K.; RECZIGEL, J.; SZENCI, O.; Early pregnancy diagnosis in sheep by progesterone and pregnancy-associated glycoprotein test. *Theriogenology*, v.59, p.1941–1948, 2003.

KAREN, A.; BOUCHRA, E. L.; AMIRI, B.; BACKERS, B.; SULON, J.; TAVERNE, A.M.; SZENCI, O. Comparison of accuracy of transabdominal ultrasonography, progesterone and pregnancy-associated glycoproteins tests for discrimination between single and multiple pregnancy in sheep. *Theriogenology*, v.66, p.314–322, 2006.

KAREN, A.; DARWISH S.;RAMOUN A.; TAWFEEK, K.; VAN HANH, N.; SOUSA, N.M.; SULON, J.; SZENCI, O.; BECKERS, J.F Accuracy of ultrasonography and pregnancy-associated glycoprotein test for pregnancy diagnosis in buffaloes. *Theriogenology*, v.68, p.1150–1155, 2007.

KAREN, A.; DARWISH, S.; RAMOUN, A.; TAWFEEK, K.; HANH, N.V.; SOUSA, N.M.; SULON, J.; SZANCI, O.; BECKERS, J.F. Accuracy of transrectal palpation for early pregnancy diagnosis in Egyptian buffaloes. *Tropical Animal Health Production*, v.43, p.5–7, 2011.

KIEWISZ, J.; SOUSA, N.M.; BECKERS, J.F.; PANASIEWICZ, G.; GIZEJEWSKI, Z.; SZAFRANSKA, B. Identification of multiple pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) purified from the European bison (*B. Bison bonasus* L.) placentas. *Animal Reproduction Science*, v.112, p.229–250, 2009.

LUCY, M.; GREEN, J.; POOK, S. Pregnancy determination in cattle: A review of available alternatives. *Proceedings, Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle*. Joplin, MO, August 31 – September 1, 2011.

LÓPEZ-GATIUS, F.; HUNTER, R.H.F.; GARBAYO, J.M.; SANTOLARIA, P.; YÁNIZ, J.; SERRANO, B.; AYAD, A.; SOUSA, N.M.; BECKERS, J.F. Plasma concentrations of pregnancy-associated glycoprotein-1 (PAG-1) in high producing dairy cows suffering early fetal loss during the warm season. *Theriogenology*, v.67, p.1324–1330, 2007.

MAJEWSKA, M.; PANASIEWICZ, G.; SZAFRANSKA, B. Pregnancy-associated glycoprotein (PAG) family localized in chorionic cells within the epitheliochorial/diffuse placenta of the alpaca (*Lama pacos*). *Acta Histochemica*, v.113, p. 570–577, 2011.

PATEL, O.V.; SULON, J.; BECKERS, J.F.; TAKAHASHI, T.; HIRAKO, M.; SASAKI, N.; DOMEKI, I. Plasma bovine pregnancy-associated glycoprotein concentrations throughout gestation in relationship to fetal number in the cow. *European Journal of Endocrinology*, v.137, p. 423–428, 1997.

PATEL, O.V.; TAKAHASHI, T.; IMAIL, K.; HASHIZUME, K.; Characterization of native and recombinant bovine pregnancy-associated glycoproteins. *Research in Veterinary Science*, v.77, p.203–210, 2004.

PIETERSE, M.C.; SZENCI, O.; WILLEMSE H.; BAJCSY, C.S.A; DIELEMAN, S.J.; TAVERNE, M.A.A. Early pregnancy diagnosis in cattle by means of linear-array real-time ultrasound scanning of the uterus and a qualitative and quantitative. *Theriogenology*, v.33, p.697–707, 1990.

PIECHOTTA, M.; BOLLWEIN, J.; FRIEDRICH, M.; HEILKENBRINKER, T.; PSSAVANTE, C.; BRANE, J.; SASSER, G.; HOEDEMAKER, M.; BOLLWEIN, H. Comparison of comercial ELISA Blood tests for eary pregnancy detection in dairy cows. *Journal of reproduction and developmente*, v.57, n.1, 2011.

REAL, L.M.M.; VALENCIA, G.L.; CORRAL, A.; RENTENIA, T. Evaluation of ultrasound for pregnancy diagnosis between 20 and 40 days post insemination in dairy cows. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, v.5, n.11, p.949-951, 2006.

ROMANO, J.E.; THOMPSON, J.A.; FORREST, D.W.; WESTHUSIN, M.E.; TOMASZWESKI, M.A.; KRAEMER, D.C. Early pregnancy diagnosis by transrectal ultrasonography in dairy cattle. *Theriogenology*, v.66, p.1034–1041, 2006.

ROMANO, J.E.; THOMPSON, J.A.; KRAEMER, D.C.; WESTHUSIN, M.E.; FORREST, D. W.; TOMASZWESKI, M.A. Early pregnancy diagnosis by palpation per rectum: Influence on embryo/fetal viability in dairy cattle. *Theriogenology*, v.67, p.486–493, 2007.

ROMANO, J.E.; LARSON, J.E. Accuracy of pregnancy specific protein-B test for early pregnancy diagnosis in dairy cattle. *Theriogenology*, v.74, p.486–493, 2010.

SASSER, R.G.; CROCK, J.; RUDER-MONTGOMERY, C.A. Characteristics of regnancyspecific protein B in cattle. *Journal Reproduction and Fertility Supplement*, v.37; p.109-113, 1989.

SILVA, E.; STERRY, R.A.; KOLB, D.; MATHIALAGAN, N.; McGRATH, M.F.; BALLAM, J.M.; FRICKE, P.M. Effect of interval to resynchronization of ovulation on fertility of lactating Holstein cows when using transrectal ultrasonography or a pregnancy-associated glycoprotein enzyme-linked immunosorbent assay to diagnose pregnancy status. *Journal of Dairy Science*, v.92, p.3643–3650, 2009.

SOUSA, N.M.; GARBAYO, J.M.; FIGEIREDO, J.R.; SULON, J.; GONÇALVES, P.B.D.; BECKERS, J.F. Pregnancy-associated glycoprotein and progesterone profiles during pregnancy and postpartum in native goats from the north-east of Brazil. *Small Ruminant Research*, v.32, p.137-147, 1999.

SOUSA, N.M. Purificação, caracterização e dosage radiológica de glicoproteínas associadas à gestação em zebuínos. 2002. 375f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

SPENCER, T.E.; JOHNSON, G.A.; BAZER, F.W.; BURGHARDT, R.C. Fetal-maternal interactions during the establishment of pregnancy in ruminants. *Society for Reproduction and Fertility Supplement*, v.64, p.379-396, 2007.

SZENCI, O.; GYULAI, G.Y.; NAGY, P.; KOVHCS, L.; VARGA, J.; TAVERNE, M.A.M. Effect of uterus position relative to the pelvic inlet on the accuracy of early bovine pregnancy diagnosis by means of ultrasonography. *Veterinary Quarterly*, v.17, p.37-39, 1995.

SZENCI, O.; BECKERS, J.F.; HUMBLLOT, P.; SULON, J.; SASSER, G.; TAVERNE, M.A. M.; VARGA, J.; BALTUSEN, R.; SCHEKK, G. Comparison of ultrasonography, bovine pregnancy-specific protein B, and bovine pregnancy-associated glycoprotein 1 test for pregnancy detection in dairy cows. *Theriogenology*, v.50, n.1, p.77-88, 1998.

TELUGU, B.P.; WALKER, A.M.; GREEN, J.A. Characterization of the bovine pregnancy-associated glycoprotein gene family--analysis of gene sequences, regulatory regions within the promoter and expression of selected genes. *BMC Genomics*, v.10; p.185, 2009.

WHITLOCK, B.K.; MAXWELL, H.S. Pregnancy-associated glycoproteins and pregnancy wastage in cattle. *Theriogenology*, v.70, p.550-559, 2008.

WOODING, F.B. Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminantes: cinucleates fusions and hormone production. *Placenta*, v.13, n.12, p.101-113, 1992.

WOODING F.B.; MORGAN, G.; BRANDON, M.R.; CAMOUS, S. Membrane dynamics during migration of placental cells through trophoctodermal tight junctions in sheep and goats. *Cell and Tissue Research*, v.276, p.387-397, 1994.

WOODING, F.B.; ROBERTS, R.M; GREEN, J.A. Light and electron microscope immunocytochemical studies of the distribution of pregnancy associated glycoproteins (PAGs) throughout pregnancy in the cow: possible functional implications. *Placenta*, v.26, n.10, p.807-27, 2005.

WOODING, P.; BURTON, G. Synepitheliochorial Placentation :Ruminants (Ewe and Cow). *Comparative placentation: structures, functions, and evolution*. Berlin, Springer, p.133-167. 2008.

XIE, S.; LOW, B.G.; NAGEL, R.J.; KRAMER, K.K.; ANTHONY, R.V.; ZOLI, A.P.; BECKERS, J.F.; ROBERTS, R.M. Identification of major pregnancy-specific antigens of cattle and sheep as inactive members of aspartic proteinase family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, v.88, p.1247-1251, 1991.

XIE, S.; LOW, B.G.; NAGEL, R.J.; BECKERS, J.F.; ROBERTS, R.M. A novel glycoprotein of the aspartic proteinase gene family expressed in bovine placental trophoctoderm, *Biology of Reproduction*, v.51, n.6, p.1145-1153, 1994.

XIE, S.; GREEN, J.; BECKERS, J.F.; ROBERTS, R.M. The gene encoding bovine pregnancy-associated glycoprotein-1, an inactive member of the aspartic proteinase family. *Gene*, v.159, p.193-197, 1995.

ZOLI, A.P.; DENEZ, P.; BECKERS, J.F.; REZNIK, M.; BECKERS, A. Light and electron microscopic immunolocalization of bovine pregnancy-associated glycoprotein in the bovine placenta. *Biology of Reproduction*, v.46, p.623–629, 1992a.

ZOLI, A.P.; GUILBAULT, L.A.; DELAHAUT, P.; BENITEZ-ORTIZ, W.; BECKERS, J.F. Radioimmunoassay of a bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum: its application for pregnancy diagnosis. *Biology of Reproduction*, v.46, p.83–92, 1992b.



PARTE 2

1 **Diagnóstico precoce de gestação em vacas zebuínas pela detecção de glicoproteínas**
2 **associadas à prenhez**

3
4 G.M. Bragança^a, R.B. Viana^b, C.C. Campello^c, S.O. Zimmerman^d, W.M. Oliveira^a, D.S.
5 Campos^a, R.L.F. Medeiros^e
6

7 ^aInstituto da Saúde e Produção Animal Universidade Federal Rural da Amazônia, Avenida Presidente Tacredo
8 Neves, 2501, Montese, Belém, Brazil. Zip code: # 6077-901. glauciaveterinaria@yahoo.com.br

9 ^bCorresponding author: Instituto da Saúde e Produção Animal Universidade Federal Rural da Amazônia,
10 Avenida Presidente Tacredo Neves, 2501, Montese, Belém, Brazil. Zip code: # 6077-901 Fone/fax + 55 (91)
11 3210-5216 rinaldovianna@hotmail.com

12 ^cFaculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará Avenida Parajana, 1700, Campu do Iatepri, Fortaleza,
13 Brazil. Zip code: # 6077-901. cccampello@yahoo.com.br

14 ^dLatin America Area Manager, IDEXX Livestock and Poultry Diagnostics
15 One IDEXX Drive, Westbrook, ME 04092, USA Silvia-Oliveira Zimmerman@idexx.com

16 ^eInstituto Evandro Chagas, Rodovia BR-316, Km 07, s/n, Levilândia, Ananindeua, Brasil. Zip code: # 67030-
17 000. renatomedeiros@iec.pa.gov.br
18
19
20

21 **Abstract**

22
23 Pregnancy-associated glycoproteins (PAG) are substances expressed in the placenta of
24 ungulate mammals. In ruminants, these proteins are secreted continuously from the embryonic
25 implantation until the delivery. This study was carried with the objective of evaluating the
26 feasibility of an PAG-ELISA for early pregnancy diagnosis in zebu beef cows, determining
27 the accuracy of the method on the 25th and 28th days after a fixed time artificial insemination
28 (TAI), comparing it with the use of ultrasound in the same period. The pregnancy was
29 checked in 130 Nellore crossbred cows on the 25th and 28th days after TAI by determination
30 of PAG on blood sample and ultrasound examinations. The rectal palpation was used as the
31 gold standard on 80th day. The accuracy of PAG-ELISA was equal on 25th and 28th days, with
32 sensitivity 100%, specificity 92,86%, positive predictive value 96,70% and negative
33 predictive value 100%. However, the ultrasound scanning had sensitivity 62,50% and
34 93,18%, specificity 95,24% and 95,24%, positive predictive value 96,49% and 97,63% and
35 negative predictive value 54,79% and 86,96% on 25th and 28th days. There were significant

36 differences between PAG-ELISA and ultrasound on the sensitivities and negative predictive
37 value. However, the tests were equivalent in specificity and positive predictive values. In
38 conclusion, the PAG-ELISA proved to be more sensitive and as specific as the ultrasound
39 during the study period, with high accuracy on the identification of non pregnant and can be
40 safely used from the 25th day after TAI for obtaining early pregnancy diagnosis in Zebu
41 females.

42 **Keywords:** Reproduction, Cattle, PAG, ELISA

43

44 **1 Introdução**

45

46 O diagnóstico precoce de gestação é importante para o incremento da eficiência
47 reprodutiva, principalmente porque possibilita a identificação de fêmeas não gestantes, para
48 que sejam submetidas a ressincronização, sobretudo quando a inseminação artificial em
49 tempo fixo ou transferência de embriões são utilizadas.

50 Dentre os métodos que permitem o diagnóstico precoce de gestação, a palpação retal
51 que geralmente é realizada entre o 40°-45° dia após inseminação, podendo ser executada entre
52 o 30°-35° dia (Lucy et al., 2011), porém neste período apresenta baixa sensibilidade (37,5%),
53 demonstrando ser um método preciso somente a partir dos 46 dias de gestação (Karen et al.,
54 2011). Contrariamente, a ultrassonografia é segura a partir do 27° dia pós-inseminação,
55 contudo antes do 27° ou 28° dia pode não haver líquido suficiente no lume uterino para
56 confirmar o diagnóstico. Assim, a acurácia de exames ultrassonográficos antes dos 30 dias de
57 gestação é 62% para os diagnósticos positivos e 66% para os negativos (Kastelic et al., 1988).

58 Atualmente, testes ELISA para a detecção de glicoproteínas associadas à prenhez
59 (PAG) têm sido empregados para diagnosticar precocemente a gestação em vacas (Piechotta
60 et al., 2011), pois, concentrações de PAG-1 estão em ascendência no sangue materno do 22°

61 dia até a última semana de gestação, sendo mensurados com alta acurácia a partir do 28º dia
62 pós-inseminação (Green et al., 2005). As PAG-1 são bons marcadores de gestação e
63 viabilidade fetal, devido sua expressão ser mais estável ao longo da prenhez, do que o fator
64 precoce da gestação, interferons e progesterona. Essas proteínas, também são conhecidas
65 como proteína-B específica da gestação (PSPB) (Sasser et al., 1989).

66 Embora, existam testes mais precoces que a determinação de PAG, como a dosagem
67 de progesterona, a viabilidade econômica do PAG-ELISA mostrou-se menos onerosa (US\$
68 2,40) do que a dosagem de progesterona (US\$ 2,48) e palpação retal (US\$ 8-10)
69 (Abdulkareem et al., 2011). Outra vantagem da detecção de PAG está relacionada ao alto
70 valor preditivo negativo dos testes comerciais. Isso significa que uma vaca diagnosticada
71 negativa, definitivamente não estará prenhe.

72 Estudos sobre a utilização de PAG para diagnóstico precoce da gestação tem sido
73 desenvolvidos em bovinos tanto de leite (Szenci et al., 1998), como de corte (Green et al.,
74 2009), todavia foram sempre conduzidos em países europeus e norte-americanos, utilizando
75 vacas leiteiras da raça Holstein e seus mestiços e bovinos de corte de raças taurinas. Portanto,
76 à exceção do estudo de Sousa (2002) que utilizou fêmeas zebuínas da raça “Azawak du
77 Niger”, a literatura demonstra uma lacuna de estudos sobre mensurações de PAG em bovinos
78 de raças zebuínas. No Brasil, há apenas um estudo que observou PAG durante a gestação de
79 ruminantes, o qual foi conduzido em cabras das raças Moxotó e Canindé (SOUSA et al.,
80 1999).

81 Assim, objetivou-se com este estudo avaliar a viabilidade de um teste ELISA para o
82 diagnóstico precoce de gestação em vacas zebuínas de corte, determinando a acurácia do teste
83 ELISA aos 25 e 28 dias após IATF, comparando-o com a utilização da ultrassonografia no
84 mesmo período.

85

86 2 Material e métodos

87

88 2.1 Local de estudo

89

90 O presente estudo foi conduzido em uma fazenda localizada no Município de São
91 Francisco do Pará (PA 320, km 14), pertencente à mesorregião do Nordeste Paraense.

92 Os animais utilizados no experimento eram mantidos conjuntamente com os demais
93 lotes de animais em fase reprodutiva da fazenda criados extensivamente em piquetes de
94 pastagens cultivadas de *Brachiaria humidicola* (Quicuío da Amazônia), *Brachiaria brizanta*
95 cv Marandu (Braquiarião) e *Panicum maximum* (Mombaça). Todos os animais da fazenda
96 recebiam suplementação mineral e água ad libitum. Os animais receberam vermifugação logo
97 após o nascimento e anualmente concomitante com a vacina contra febre aftosa. Também
98 eram vacinados contra carbúnculo sintomático, raiva e brucelose.

99

100

101 2.2 Desenho experimental

102

103 O grupo amostral foi composto por 130 fêmeas zebuínas mestiças da raça Nelore (*Bos*
104 *taurus indicus*) saudáveis e com escore de condição corporal médio igual a 3,0 (escala de 1 a
105 5, segundo Houghton et al., 1990) que foram submetidas a um protocolo de IATF utilizado
106 rotineiramente no manejo reprodutivo do rebanho (Figura 3). Todas as fêmeas submetidas ao
107 protocolo de IATF apresentaram um período de involução uterina de no mínimo 30 dias.

108

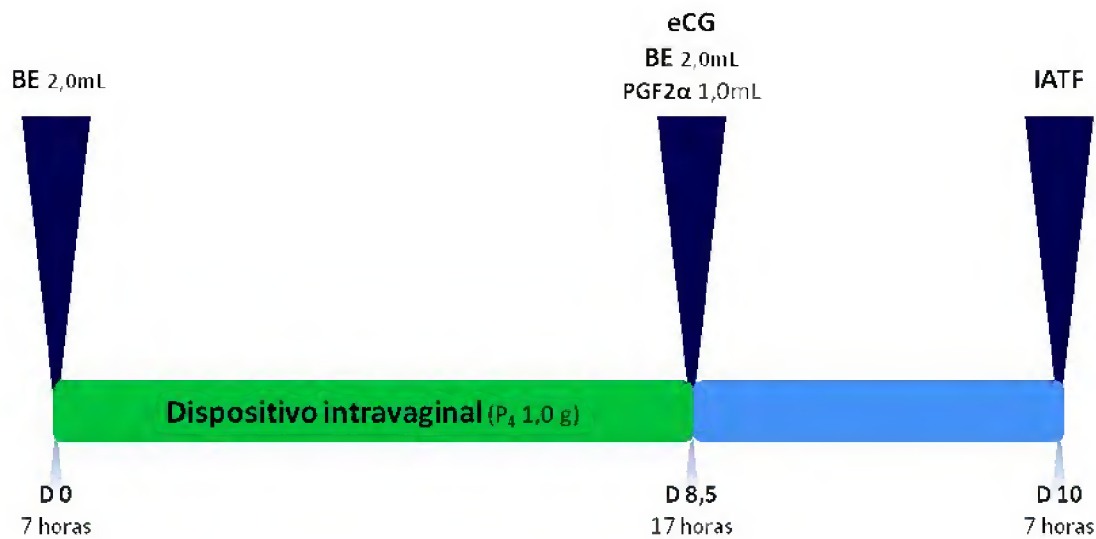


Figura 4. Protocolo utilizado para indução do estro, sincronização da ovulação e inseminação artificial em tempo fixo utilizado nos animais do experimento.

2.3 Colheita de sangue e processamento das amostras

No dia 0 pela manhã (07h00min), introduziu-se um dispositivo intravaginal de progesterona² 1,0 g e aplicou-se 2,0 mL (2mg) de benzoato de estradiol³ por via intramuscular. Durante a tarde (17h00min) do 8º dia (D8,5) foram removidos os dispositivos intravaginais e administrado por via intramuscular 1,5 mL de eCG⁴, 1,0 mL de benzoato de estradiol e 1,0 mL de D-Cloprostenol⁵. Na manhã do 10º dia (07h00min), os animais foram inseminados.

Foram realizadas colheitas de sangue de todas as vacas do grupo experimental no 25º e 28º dia pós-IATF (Figura 5), sendo colhido 10 mL de sangue por punção da veia jugular externa, sem garroteamento excessivo do vaso, utilizando-se tubos vacutainer siliconizados sem anticoagulante e devidamente identificados. As amostras foram centrifugadas por 15

² DIB®, MSD Saúde Animal

³ Gonadiol®, MSD Saúde Animal

⁴ Folligon®, MSD Saúde Animal

⁵ Vetaglan®, Hertape Calier

126 minutos a uma velocidade de 1.150 G, sendo a seguir separadas por aspiração do soro,
127 aliquotadas em microtubos tipo eppendorf identificados, que foram acondicionados a -20 °C
128 para posterior análise de PAG.

129



130

131 **Figura 5.** Ilustração esquemática do desenho experimental desenvolvido no presente estudo.

132

133

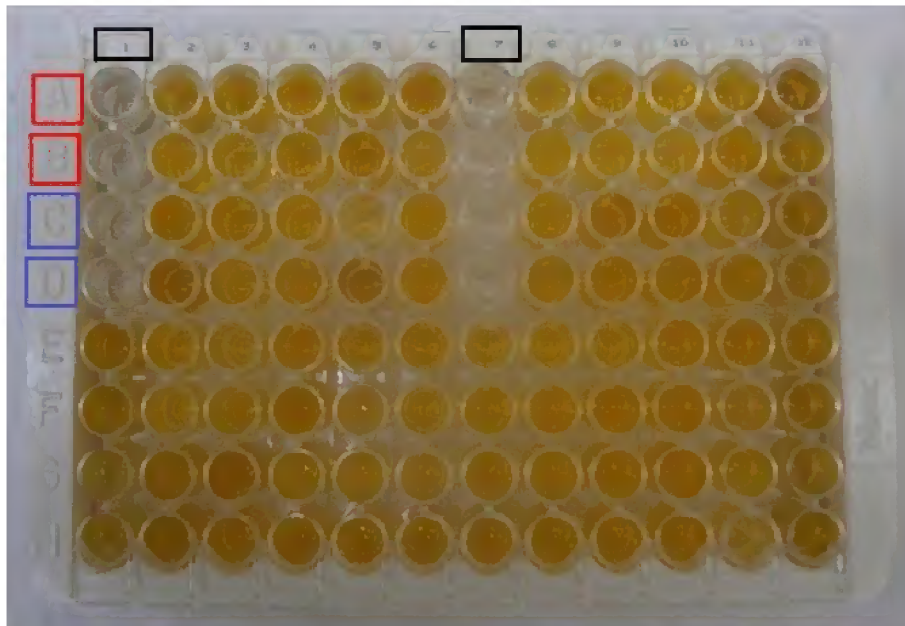
134 2.4 Determinação de PAG

135

136 Para determinação das PAG, utilizou-se um kit ELISA, o “Bovine Pregnancy Test⁶”,
137 que consiste na detecção de glicoproteínas associadas à prenhez no soro bovino como
138 indicador da gestação. As análises foram realizadas no Laboratório de Virologia da Seção de
139 Meio Ambiente do Instituto Evandro Chagas, seguindo o protocolo recomendado pelo
140 fabricante.

141 Após descongelamento das amostras (temperatura ambiente), foram colocados em
142 cada poço da placa de microtitulação 25 µl de solução diluente; em seguida, foram
143 adicionados 100 µl de solução controle negativo nos dois primeiros poços da tira 1 e 100 µl
144 de solução controle positivo nos dois poços subsequentes, sendo os demais poços preenchidos
145 com 100 µl de cada amostra de soro bovino (Figura 6).

⁶ IDEXX laboratories, USA



146

147 **Figura 6.** Distribuição dos controles e amostras na placa. Tiras 1 e 7: A e B, controles
148 negativos; C e D, controles positivos.

149

150

151

152 Ao final, a placa foi coberta com um adesivo para evitar evaporação e incubada por 60
153 minutos (± 5 minutos) a 37°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) em incubadora de microplacas⁷ (Figura 7).

153



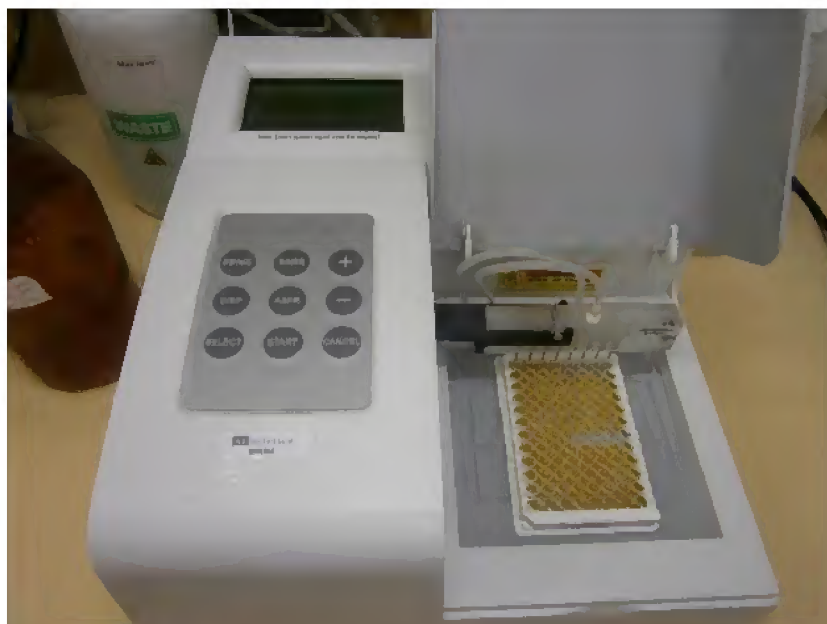
154

155 **Figura 7.** Incubação da placa a 37°C (60 min).

⁷ ELISA Stat Fax – 2200

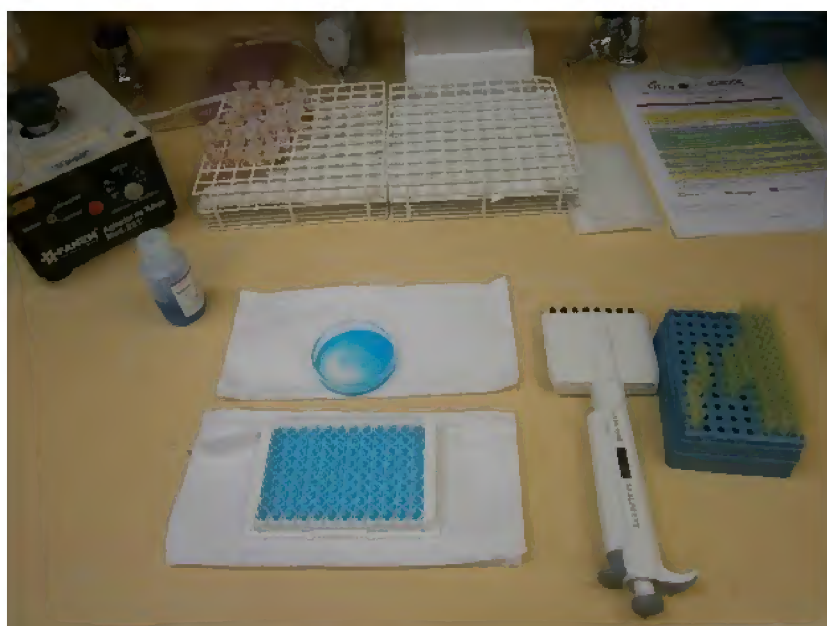
156 Após a incubação, os poços da placa foram aspirados e lavados quatro vezes em uma
157 lavadora automática para microplacas⁸ (Figura 8), posteriormente foram distribuídos 100 µl
158 de solução detectora em cada poço da placa (Figura 9) e esta foi novamente incubada por 30
159 minutos (\pm 2 min.), à temperatura ambiente (18-25 °C).

160



161
162
163
164

Figura 8. Etapa de lavagem da placa de ELISA.



165
166
167

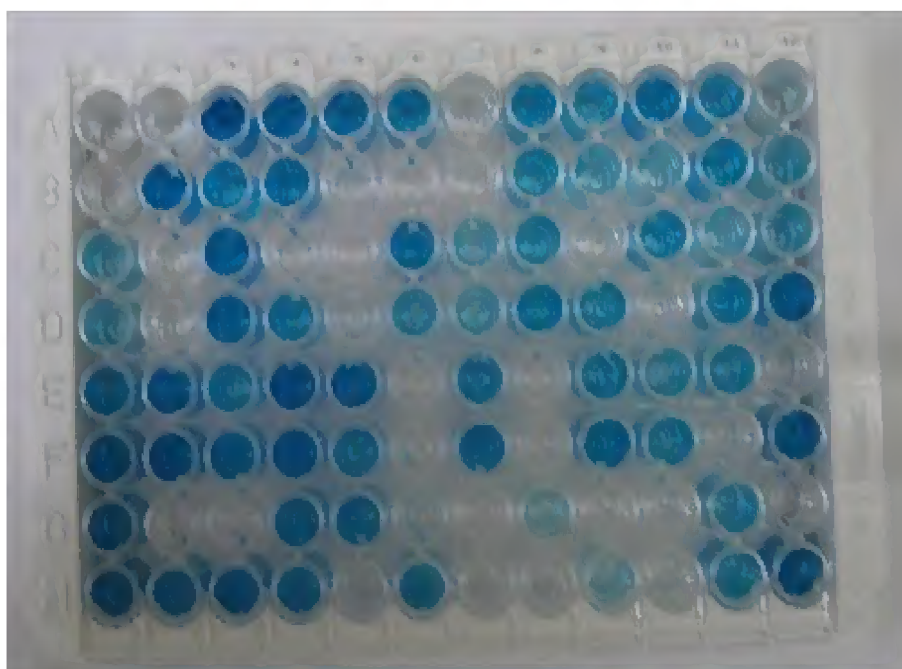
Figura 9. Etapa de pipetagem com solução detectora

⁸ ELISA TP-Washer Thermo Plate

168 Seguida a incubação, aspiração e lavagem da placa, foram colocados 100 μ L de
169 solução conjugado peroxidase de rábano silvestre (horseradish peroxidase – HRPO) em todos
170 os poços e uma nova incubação por 30 minutos (\pm 2 min) à temperatura ambiente (18-25 °C)
171 foi realizada, seguidas de novas aspiração e lavagem.

172 Posteriormente, foram distribuídos 100 μ l de solução substrato tetrametilbenzidina
173 (TMB) em cada poço, sendo a placa coberta e incubada por 15 minutos \pm 1 min à temperatura
174 ambiente (18-25 °C). Finalizada esta etapa, as amostras reagentes à PAG apresentaram
175 coloração azul e as não reagentes apresentaram-se translúcidas (Figura 10). Em seguida,
176 foram adicionadas às cavidades 100 μ l de solução de interrupção da reação que promoveu
177 mudança da coloração final (Figura 11).

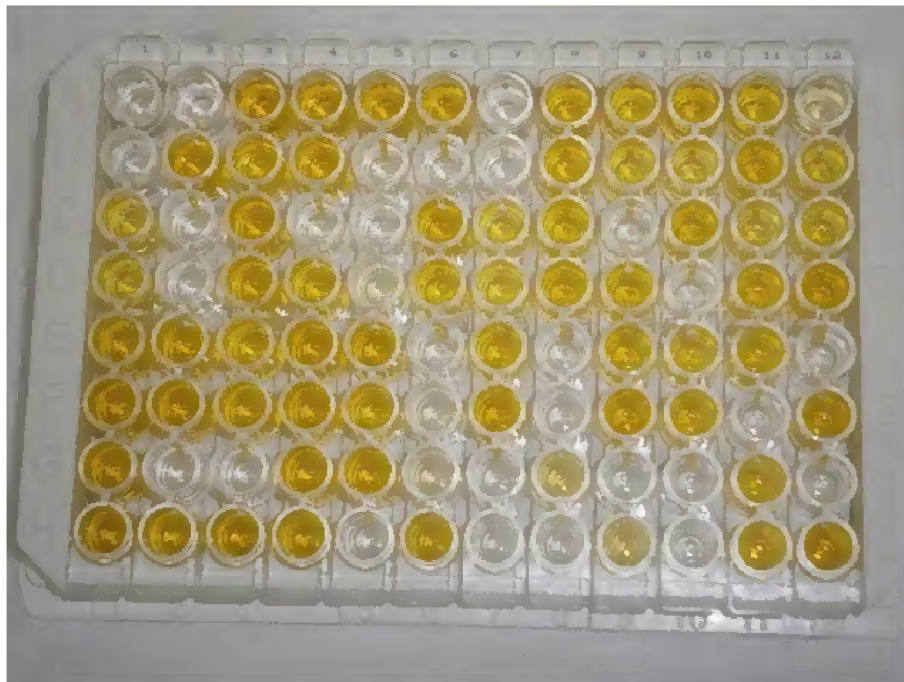
178



179

180 **Figura 10.** Teste ELISA mostrando a coloração azul das amostras reagentes a PAG na etapa
181 pós-incubação com solução substrato TMB. Belém-Pará, 2012.

182



183

184 **Figura 11.** Teste ELISA mostrando o resultado final, onde a coloração amarela das amostras
 185 indica a presença de PAG (prenhe) e a coloração translúcida, ausência de PAG (não prenhe).
 186 Belém-Pará, 20121.

187

188 A leitura foi realizada com absorvância de 450 nm e comprimento de onda de
 189 frequência de 620 nm. Os resultados de densidade óptica (D.O) fornecidos pela leitora foram
 190 anotados na ficha e utilizados para calcular a validação do teste e posteriormente os resultados
 191 das amostras de acordo com as especificações do fabricante do Kit de diagnóstico (Quadro 2).

192

193 **Quadro 2.** Fórmulas utilizadas para calcular o diagnóstico da prenhez e interpretação dos
 194 resultados.

195

Cálculo dos diagnósticos de prenhez	
Média do controle negativo	$NCx = (NC1 + NC2)/2$
Média do controle positivo	$PCx = (PC1 + PC2)/2$
Validação do teste	$PCx - NCx \geq 0,300$ e $NCx \leq 0,150$
Resultado das amostras (diagnóstico)	$S-N = amostra - NCx$
Interpretação dos resultados	
$S-N < 0,300$	Não prenhe (-)
$S-N \geq 0,300$	Prenhe (+)

196

197

NC = negative control (controle negativo), PC = positive control (controle positivo), S-N = Sample – Negative (amostra – negativo)

198 A leitura visual (LV) da coloração final (Figura 11) também constituiu um indicador
199 de resultado, sendo as amostras com coloração amarela positiva (prenhe) e as translúcida
200 negativa (não prenhe), esses resultados também foram anotados na ficha de controle
201 laboratorial O desenvolvimento da coloração é proporcional à quantidade de PAG da amostra.

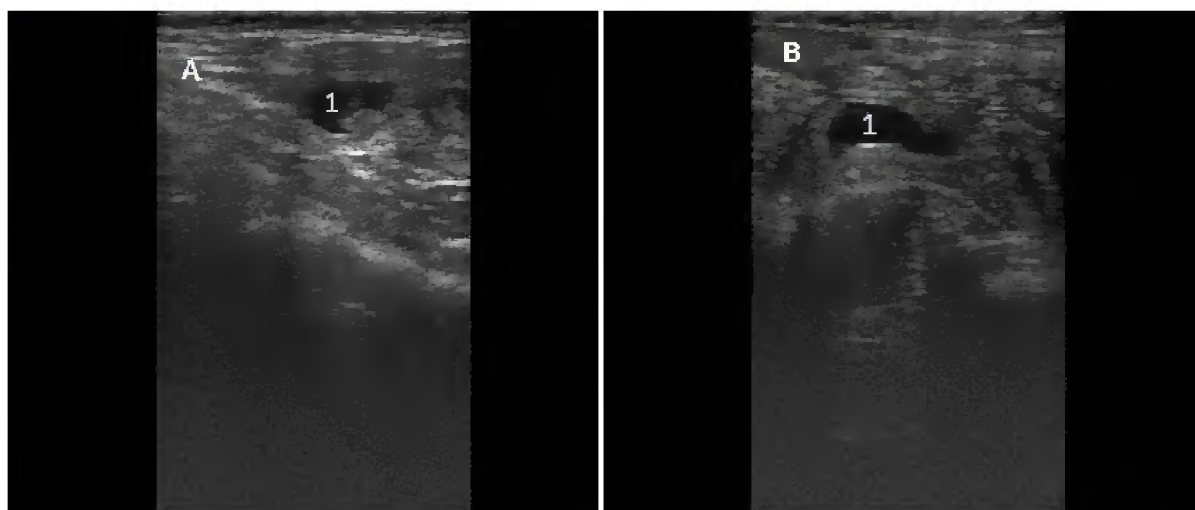
202

203 2.5 Exames ultrassonográficos

204

205 Ao 25° e 28° dia após a IATF (Figura 12) foram realizados exames ultrassonográficos
206 utilizando uma probe 7,5 MHz⁹. O critério para o diagnóstico de gestação positivo foi à
207 observação do fluido alantóico e ou visualização do concepto propriamente dito, segundo
208 Szenci et al. (1995). As avaliações ultrassonográficas ocorreram em ambiente com adequada
209 iluminação natural e foram conduzidas pelo mesmo médico veterinário examinador ao 25° e
210 28° dia.

211



212

213 **Figura 12.** Images ultrassonográficas caracterizando prenhez em vaca. (A) 25° dia de
214 gestação, pequeno acúmulo de líquido no lume uterino. (B) 28° dia de gestação, visualização
215 do líquido amniótico, porém embrião não visível no interior do saco gestacional. Belém-Pará,
216 2012.

217

⁹ Ultrassom DP 6900 Mindray

218 2.6 Palpação retal

219

220 A palpação retal foi o método escolhido como padrão ouro para posterior confirmação
221 da gestação, por isso todas as vacas foram palpadas aos 80 dias após a IATF.

222

223 2.7 Análise estatística

224

225 Os resultados verificados foram classificados como diagnóstico positivo correto (a),
226 diagnóstico positivo incorreto (b), diagnóstico negativo correto (c), diagnóstico negativo
227 incorreto (d). A partir desses valores foram calculados de cada método a sensibilidade ($100 \times a/a + d$),
228 a especificidade ($100 \times c/c + b$), o valor preditivo positivo ($100 \times a/a + b$) e o valor
229 preditivo negativo ($100 \times c/c + d$) conforme descrito por Karen et al. (2011). O teste do Qui-
230 quadrado foi utilizado para comparar as sensibilidades e especificidades dos métodos de
231 diagnóstico de gestação ELISA-PAG e ultrassonografia. Diferenças entre vacas prenhes e não
232 prenhes para o ELISA-PAG foram analisadas usando o test-t Student's.

233

234 3 Resultados e discussão

235

236 3.1 Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da 237 ultrassonografia e do ELISA-PAG

238

239 Embora alguns estudos tenham proposto a utilização de testes ELISA para
240 determinação de PAG com objetivo de diagnosticar precocemente a gestação em várias
241 espécies de ruminantes, poucos abordaram a acurácia (sensibilidade, especificidade, valor
242 preditivo positivo e valor preditivo negativo) do método em bovinos; o mesmo tem ocorrido
243 com a ultrassonografia em estudos de diagnóstico precoce de prenhez.

244 A palpação retal, método escolhido com padrão ouro por apresentar máximas
 245 sensibilidade e especificidade depois dos 50 dias (Karen et al., 2011), aos 80 dias pós-IATF
 246 apresentou um taxa de prenhez de 67,69% (88/130) e 32,31% (42/130) de vacas não
 247 gestantes. Estes dados foram iguais àqueles obtidos no ELISA-PAG (Tabela 1), com iguais
 248 acurácias tanto ao 25º como ao 28º dia pós-IATF. Todavia, as taxas de prenhezes obtidas pela
 249 ultrassonografia não corresponderam àquelas obtidas à palpação retal.

250

251 **Tabela 1.** Resultados positivos corretos, falsos positivos, resultados negativos corretos, falsos
 252 negativos, sensibilidade (%), especificidade (%), valor preditivo positivo (%) e valor preditivo
 253 negativo (%) para o diagnóstico precoce da gestação em vacas zebuínas utilizando-se os
 254 métodos ELISA-PAG e ultrasonografia.

255

	ELISA-PAG		US	
	25 dias	28 dias	25 dias	28 dias
Resultados positivos corretos	88	88	55	82
Falsos positivos	3	3	2	2
Resultados negativos corretos	39	39	40	40
Falsos negativos	0	0	33	6
Sensibilidade (%)	100,00	100,00	62,50	93,18
Especificidade (%)	92,86	92,86	95,24	95,24
Valor preditivo positivo (%)	96,70	96,70	96,49	97,62
Valor preditivo negativo (%)	100,00	100,00	54,79	86,96

256

257 Observaram-se diferenças significativas para a sensibilidade entre os exames de
 258 detecção de glicoproteínas associadas à prenhez (PAG) e a ultrasonografia (US) nos períodos
 259 considerados, de 25 e 28 dias (Tabela 2). A US detectou apenas 62,50% das gestações
 260 existentes no dia 25, elevando significativamente ($p < 0,05$) a sensibilidade para 93,18% no
 261 dia 28. Porém, em ambos os períodos a dosagem de PAG apresentou sensibilidade
 262 significativamente maior, permitindo a identificação de 100,00% das gestações existentes.

263 Deste modo, infere-se que mesmo precocemente com apenas 25 dias pós-IATF o teste foi
264 capaz de identificar a prenhez quando de fato estava presente.

265 **Tabela 2.** Sensibilidade (%) obtida para o diagnóstico precoce da gestação em vacas zebuínas
266 utilizando-se os métodos ELISA-PAG e ultrasonografia.
267

Método de diagnóstico	25 dias	28 dias
PAG	100,00% (88/88) ^{Aa}	100,00% (88/88) ^{Aa}
US	62,50% (55/88) ^{Bb}	93,18% (82/88) ^{Ab}

268 Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre colunas (dias).

269 Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre linhas (métodos).

270

271

272 Os resultado do presente estudo corroboram aqueles descritos por Green et al. (2009)
273 que avaliaram um teste ELISA-PAG para o diagnóstico precoce de gestação em bovinos de
274 corte entre 29 e 56 dias e leiteiros entre 25 e 45 dias após a inseminação, obtendo
275 sensibilidades iguais a 100% em bovinos de corte e a $99,8 \pm 0,2\%$ em bovinos leiteiros. Vale
276 ressaltar que Green et al. (2009) utilizaram um intervalo de avaliação de até 56 dias, ou seja
277 duas vezes maior do que aquele adotado nesse estudo para detecção de PAG (28 dias). É
278 sabido que as PAG aumentam continuamente com o avançar da gestação (Sousa, 2002),
279 favorecendo assim os resultados de Green et al. (2009) por terem feito uma avaliação em um
280 período mais tardio.

281 Todavia, os resultados obtidos para sensibilidade tanto aos 25 como aos 28 dias pós-
282 inseminação são discordantes daqueles observados por Szenci et al. (1998) que descreveram
283 em vacas leiteiras entre 26-27 dias após inseminação, sensibilidades de 81,2% para um
284 sistema RIA-PAG descrito por Zoli et al. (1992) e 75% através de um RIA-PSPB descrito por
285 Humblot et al. (1988), além de sensibilidades iguais a 95,2% para o RIA-PAG e 92% para o
286 RIA-PSPB entre 29-30 dias pós-inseminação.

287 Como as sequências de nucleotídeos que codificam as PSPB e PAG-1 tem
288 demonstrado que PAG-1 (alvo do presente estudo) é homóloga a uma das variantes de PSPB
289 (Sasser et al., 2009) e do ponto de vista bioquímico, PSPB é a mesma coisa que PAG-1
290 (Green et al., 2005), as diferenças de sensibilidades obtidas no presente estudo (100%) e
291 aquelas observadas por Szenci et al. (1998), provavelmente se devam às distintas técnicas
292 utilizadas, pois enquanto no presente estudo se utilizou um ELISA para detecção das PAG,
293 Szenci et al. (1998) adotaram técnicas de RIA. As concentrações de PAG podem variar
294 conforme a técnicas de RIA utilizada (Ayad et al., 2009), além do que a imunoreatividade da
295 PAG surge mais cedo ao ELISA do que em técnicas de RIA (Green et al., 2005).

296 Em relação à precocidade do diagnóstico, este estudo obteve seus resultados cinco dias
297 mais cedo e sem comprometimento da sensibilidade do teste, que aqueles descritos por
298 Piechotta et al. (2011) em vacas leiteiras (30 – 41 dias) e Green et al. (2009) em bovinos de
299 corte (29 – 56 dias) e três dias mais cedo do que o relatado por Romano e Larson (2010) em
300 bovinos leiteiros (28, 30 e 35 dias), demonstrando a confiabilidade do método na identificação
301 precoce de fêmeas gestantes logo ao 25º dia pós-IATF.

302 A baixa sensibilidade da ultrassonografia antes do 28º dia no diagnóstico da gestação
303 (Tabela 2) observada nesse estudo corrobora as observações de Real et al. (2006) que
304 descreveram sensibilidades de 50% em vacas entre 20-25 dias e 79% em vacas entre 26-30
305 dias pós-serviço. Szenci et al. (1998) obtiveram sensibilidades à ultrassonografia iguais a
306 45,3% entre 26 – 27 dias e 76,1% entre 29 – 30 dias, quando o critério para diagnóstico de
307 gestação positivo foi o reconhecimento do embrião propriamente dito com batimentos
308 cardíacos e 82,8% entre 26 – 27 dias e 90,4% entre 29 – 30 dias, quando o critério de
309 diagnóstico positivo foi apenas o reconhecimento do fluido alantoico. Em búfalas também se
310 observou um comportamento de sensibilidade do exame sonográfico semelhante àquele
311 descrito para vacas em que estudos demonstraram uma sensibilidade de 86,7% no diagnóstico

312 de gestação entre 25-30 dias, atingindo 100% somente entre o 31º-35º dia pós-inseminação
313 (Karen et al., 2007).

314 Essa baixa sensibilidade da ultrassonografia ocorreu devido ao alto número de falsos
315 negativos em relação ao padrão ouro, pois mesmo observando cautelosamente as curvaturas
316 do corno ipsilateral ao corpo lúteo, que segundo Kastelic et al. (1988) é o local onde
317 encontra-se o conceito até o 25º dia, nem sempre foi possível a visualização da vesícula
318 gestacional (anaecóica), concordando com Barros e Visintin (2001) que relataram
319 dificuldades na interpretação da imagem em períodos precoces, pois o líquido alantóico pode
320 ser confundido com líquidos patológicos ou fisiológicos, inferindo ainda que em animais sob
321 condições de campo, a visualização da vesícula gestacional tornou-se mais evidente aos 28
322 dias de gestação, conferindo maior segurança para o diagnóstico de prenhez, diferentemente
323 das observações citadas por Kastelic et al. (1988) em animais sob controle experimental, que
324 diz ser possível a visualização do embrião propriamente dito com o batimentos cardíacos
325 entre 19 – 24 dias de gestação.

326 Pode se observar que não houve diferenças significativas para a especificidade entre os
327 exames de detecção de glicoproteínas associadas à prenhez e ultrassonografia nos períodos
328 considerados. Em ambos os períodos, a dosagem de PAG e a US apresentaram
329 especificidades de 92,86% e 95,24%, respectivamente (Tabela 3). Tais resultados indicam que
330 esses testes podem, ocasionalmente, indicar falsos resultados positivos, sem que haja gestação
331 de fato.

332
333

334 **Tabela 3.** Especificidade (%) obtida para o diagnóstico precoce da gestação em vacas
 335 zebuínas utilizando-se os métodos ELISA-PAG e ultrasonografia
 336

Método de diagnóstico	25 dias	28 dias
PAG	92,86% (39/42) ^{Aa}	92,86% (39/42) ^{Aa}
US	95,24% (40/42) ^{Aa}	95,24% (40/42) ^{Aa}

337 Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre colunas (dias).

338 Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre linhas (métodos).

339

340

341 A especificidade do ELISA-PAG foi semelhante às especificidades descritas por
 342 Green et al. (2009) em bovinos leiteiros ($91,7 \pm 1,4\%$) entre 25°-45° dia de gestação e em
 343 bovinos de corte ($92,3 \pm 3,0\%$), entre 29°-56° dia de gestação e àquelas descritas por Piechotta
 344 et al. (2011) ao utilizarem um ELISA comercial qualitativo (97,1%) e ELISA imunométrico
 345 quantitativo (91,2%). Todavia, houve discordância dos valores descritos neste estudo com as
 346 especificidades relatadas por Szenci et al. (1998) entre 26-27 dias para o RIA-PSPB (85,1%) e
 347 RIA-PAG (56,7%) e 29-30 dias para o RIA-PSPB (82,6%) e RIA-PAG (69,3%). Estas
 348 diferenças provavelmente estão também relacionadas aos distintos métodos utilizados
 349 ELISA e RIA já citadas anteriormente.

350 Do mesmo modo, a especificidade obtida no presente estudo para o exame
 351 ultrassonográfico corrobora as observações relatadas por Romano et al. (2006) ao referirem
 352 uma especificidade de 93% em vacas (24-30 dias de gestação) e 93,4% em novilhas (21-27 dias
 353 de gestação) e por Karen et al. (2007) em búfalas de 93,3% entre 25 e 30 dias de prenhez.
 354 Entretanto, foi menor que aquela descrita por Gradela et al. (2009) ao 28° dia (100%).

355 Embora ambos os métodos de diagnóstico de gestação avaliados neste estudo tenham
 356 demonstrado altas especificidades para o período estudado (25° e 28° dia), indicando que as
 357 duas técnicas são capazes de identificar as fêmeas não prenhes quando realmente não há
 358 gestação, verifica-se que há uma pequena possibilidade de ocorrerem falsos positivos em
 359 ambos os métodos, já que ambas as técnicas não atingiram 100% de especificidade.

360 Os resultados falsos positivos obtidos ao ELISA-PAG podem ser atribuídos às perdas
361 embrionárias ou fetais ocorridas após o 28º dia (realização do último exame de sangue), visto
362 que se as perdas embrionárias tivessem ocorrido antes desse período teria havido redução da
363 densidade óptica do 25º dia para a do 28º dia, ao contrário em todas as vacas avaliadas o
364 valor da densidade óptica obtido no 25º dia foi sempre inferior àquele aferido ao 28º dia para
365 os mesmos animais, indicando uma ascensão constante das concentrações de PAG.

366 A ocorrência de falsos positivos ao ELISA devido à persistência da PAG no pós-parto
367 não pode ser considerada no presente estudo, pois todas as vacas na ocasião da primeira
368 colheita de sangue (25º dia) se encontravam em um período pós-parto superior a 60 dias
369 (margem de segurança segundo o fabricante do teste). Dos três falsos positivos ao ELISA-
370 PAG dois também foram falsos-positivos à ultrassonografia, ao 25º e 28º dia, reforçando a
371 hipótese de perda gestacional posterior a esse período. Por isso, atribuiu-se que os resultados
372 considerados como falsos positivos à ultrassonografia também se deram por perdas
373 gestacionais ocorridas posteriormente ao exame sonográfico, o que não permitiu a
374 confirmação da gestação à palpação retal.

375 Os exames de detecção de glicoproteínas associadas à prenhez e ultrassonografia
376 foram equivalentes em relação ao valor preditivo positivo nos períodos considerados (Tabela
377 4). Os resultados indicaram que o percentual de positivos verdadeiros entre todos os positivos
378 acusados pelo exame variou de 96,49% a 97,62%, isto é, nem todos os resultados positivos o
379 são de fato.

380

381

382 **Tabela 4.** Valor preditivo positivo (%) obtido para o diagnóstico precoce da gestação em
 383 vacas zebuínas utilizando-se os métodos ELISA-PAG e ultrassonografia.
 384

Método de diagnóstico	25 dias	28 dias
PAG	96,70% (88/91) ^{Aa}	96,70% (88/91) ^{Aa}
US	96,49% (55/57) ^{Aa}	97,62% (82/84) ^{Aa}

385 Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre colunas (dias).

386 Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre linhas (métodos).

387

388 O valor preditivo positivo do teste de detecção de PAG no período proposto neste
 389 estudo foi semelhante aos valores descritos por Piechotta et al. (2011) para dois diferentes
 390 métodos ELISA (99,3% e 97,8%), porém foi maior do que os determinados por Abdulkareem
 391 et al. (2011) em búfalas entre 22-24 dias (72,72%) e entre 32-34 dias (90%) pós-inseminação.

392 Infere-se essa cizânia de resultados às diferentes espécies, pois conforme descrito por
 393 Haugejorden et al. (2006) e Garbayo et al. (2008) a espécie pode influenciar as concentrações
 394 de PAG, como também, consoante Abdulkareem et al. (2011) uma menor afinidade dos
 395 anticorpos do método utilizado na espécie bubalina, pode ser possível. Contudo, a diferença
 396 de resultados também pode ser atribuída ao período gestacional, pois segundo Green et al.
 397 (2005) a partir do 22º dia já é possível a detecção de PAG, porém a imunorreatividade dessa
 398 proteína aumenta consideravelmente entre o 24º e o 28º dia e mantém-se em ascensão até a
 399 última semana de gestação, conferindo portanto maior segurança para fins de diagnóstico de
 400 gestação a partir deste período.

401 O valor preditivo positivo do exame sonográfico também é similar aos resultados
 402 descritos por Real et al. (2006) ao citarem valores iguais a 93% e por Szenci et al. (1998)
 403 entre 26-27 dias (96,6%) e entre 29-30 dias (97,9%) após inseminação.

404 Houve diferenças significativas no valor preditivo negativo entre os exames de
 405 detecção de glicoproteínas associadas à prenhez (PAG) e ultrassonografia (US) nos períodos
 406 de 25 e 28 dias (Tabela 5).

407 **Tabela 5.** Valor preditivo negativo (%) obtido para o diagnóstico precoce da gestação em
 408 vacas zebuínas utilizando-se os métodos ELISA-PAG e ultrassonografia.
 409

Método de diagnóstico	25 dias	28 dias
PAG	100,00% (39/39) ^{Aa}	100,00% (39/39) ^{Aa}
US	54,79% (40/73) ^{Bb}	86,96% (40/46) ^{Ab}

410 Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre colunas (dias).

411 Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre linhas (métodos).

412

413 Todos os resultados negativos obtidos pela dosagem de PAG eram, efetivamente,
 414 negativos. Contudo, na US realizada aos 25 dias de prenhez, somente 54,79% dos resultados
 415 negativos realmente não constituíam gestações de fato. Embora, tenha havido um aumento
 416 significativo do valor preditivo negativo do dia 25 para o dia 28 na US (86,96%), ainda assim
 417 esse valor foi significativamente menor do que aquele obtido pela dosagem de PAG
 418 (100,00%).

419 O valor preditivo negativo máximo ao ELISA-PAG foi alcançado no presente estudo,
 420 indicando a exatidão do teste na detecção de fêmeas não gestantes e corroborando com os
 421 resultados de Green et al. (2009) para bovinos de corte (100%). Entretanto, este valor foi
 422 ligeiramente superior ao valor preditivo negativo descrito por Romano e Larson (2010) para
 423 bovinos leiteiros (94,7%) e aqueles citados por Piechotta et al. (2011) para dois diferentes
 424 testes ELISA (91,7% e 91,2%). Isso deve ao fato de não ter ocorrido diagnóstico falso
 425 negativo no presente estudo.

426 Contrariamente, o valor preditivo negativo da US ao 25º dia foi inferior ao descrito por
 427 Szenci et al. (1998) entre 26-27 dias após inseminação, quando o critério para diagnóstico
 428 positivo foi a identificação do concepto com batimentos cardíacos (67,5%). Essa diferença
 429 ocorreu devido a dificuldade de observação da vesícula gestacional ao 25ª dia neste estudo,
 430 entretanto, ao 28º dia o valor preditivo negativo observado no presente estudo foi semelhante
 431 ao descrito por Szenci et al. (1998), entre 26-27 dias quando o critério para diagnóstico

432 positivo foi o reconhecimento do fluido alantóico (86,4%). Embora tenha ocorrido essa
433 elevação do valor preditivo negativo ao 28º, ainda assim, foi inferior aos resultados obtidos
434 por Gradela et al. (2009) ao que obteve 100% de acurácia em exames ultrassonográficos
435 realizados ao 28º dia pós IATF, cujo o mesmo relatou não existir dificuldade de interpretação
436 da imagem neste período.

437 O alto percentual de falsos negativos ao exame ultrassonográfico neste estudo,
438 especialmente ao 25º dia, pode ser justificado pela pouca quantidade de líquido no lume
439 uterino, dificultando o diagnóstico de gestação, ou pela impossibilidade de se visualizar o
440 embrião que pode ficar posicionado atrás de dobras endometriais, segundo descrito por
441 Descôteaux et al. (2009). Conforme Kastelic et al. (1988) a acurácia de exames
442 ultrassonográficos antes dos 30 dias de gestação para diagnósticos positivos é em torno de
443 62% e para os negativos 66%. Do mesmo modo, Barros e Visintin (2001) atribuíram a
444 ocorrência de erros à maior dificuldade na interpretação das imagens quando os batimentos
445 cardíacos não são observados.

446

447 3.2 Relação benefício-custo dos métodos de detecção de PAG, ultrassonografia e palpação
448 retal.
449

450 De acordo com os resultados obtidos e discutidos com os trabalhos da literatura
451 coligida optou-se por elencar as vantagens e desvantagens dos métodos estudados (Quadro 3)
452 para possibilitar uma análise da relação benefício/custo dos métodos ELISA-PAG,
453 ultrassonografia e palpação retal.

454

455 **Quadro 3.** Vantagens e desvantagens dos métodos ELISA-PAG, ultrassonografia e palpação
 456 retal para o diagnóstico de gestação.
 457

Método	Vantagens	Desvantagens
ELISA-PAG	Precocidade do diagnóstico (seguro a partir de 25º dia pós-inseminação)	Resultado depois de 2h30min
	Método menos invasivo, sendo necessários apenas 2mL de sangue	Não é recomendado em vacas com puerpério inferior a 60 dias.
	Pode ser realizado por mão-de-obra treinada; Identificação precoce de vacas não prenhes após IATF com redução do tempo de ressincronização e inseminação e, consequentemente do intervalo entre partos	Necessidade de suporte laboratorial.
	As PAG conservam-se até 10 dias no sangue em temperatura ambiente (viável em viagens)	
	Investigação de mortalidades embrionária e fetal (decréscimo nos níveis de PAG)	
	A estrutura necessária para a realização do teste de PAG, pode ser utilizada para execução de outros testes ELISAs para diagnóstico de doenças infectocontagiosas	
Ultrassonografia	Resultado em tempo real	Necessário um aparelho de ultrassom com probe linear (trasretal)
	Precocidade (maior acurácia a partir do 30º dia)	
	Sexagem fetal (entre 55-60 dias de gestação); Investigação de mortalidades embrionárias precoce	Realizado apenas por médico veterinário especializado.
	Identificação de gestações múltiplas entre (55-60 dias de gestação)	
	Manejo de doadoras e receptoras de embriões	
Palpação retal	Resultado em tempo real;	Somente é seguro entre 40 e 45 dias
	Não há necessidade de equipamentos	Não diagnostica mortes embrionárias

458

459 O valor do diagnóstico de gestação por palpação retal varia entre R\$ 3,00 a 7,00 por
 460 animal (informação verbal)¹⁰, enquanto o custo do diagnóstico de gestação por
 461 ultrassonografia varia entre R\$ 3,00 a 10,00 cada (informação verbal)¹¹. O ELISA-PAG
 462 utilizado neste estudo foi recentemente lançado nos Estados Unidos da América onde os
 463 produtores colhem o sengue na fazenda e enviam aos laboratórios agropecuários privados.
 464 Deste modo, o custo do teste por amostra fica em torno de US\$ 1,80 para os laboratórios. Os
 465 laboratórios cobram dos clientes de acordo com o número de amostras, como acontece no
 466 Centro de Diagnóstico Veterinário da Universidade de Nebraska-Lincoln (Quadro 4)
 467 (NEBRASKA..).

468

469 **Quadro 4.** Custo do teste de detecção de PAG nos EUA.

Número de amostra	Preço (valor/amostra)
	Dólar (US\$)
1 – 2	15,00
3 – 50	5,00
> 51	3,50

470

471 Para ilustrar as diferenças de custo dos testes para diagnóstico precoce da gestação em
 472 bovinos de corte, na tabela 6 apresenta-se e uma simulação realizada, considerando um
 473 rebanho de 1.000 vacas de corte.

474

¹⁰ CASMIL - Cooperativa Agropecuária do Sudoeste Mineiro Ltda, informação obtida por telefone, em 20 de março de 2012.

¹¹ Cavalcante K. N., Médica Veterinária autônoma, comunicação pessoal obtida por telefone, em 19 de março de 2012. keilecavalcante@bol.com.br

475 **Tabela 6.** Simulação dos custos do diagnóstico de gestação por palpação retal,
476 ultrassonografia e ELISA-PAG para um rebanho de 1.000 vacas de corte.
477

Método	Custo (US\$ / animal)	Simulação rebanho com 1.000 vacas de corte
Palpação retal	2,49	2.490,00
Ultrassonografia	3,59	3.590,00
ELISA-PAG-*	3,50	3.500,00
ELISA-PAG **	1,80	1.800,00

478 *NEBRASKA

479 **Preço do Fabricante

480

481 Embora, tanto a ultrassonografia e detecção de PAG sejam mais onerosas que a
482 palpação retal, estes se tornam mais vantajosos, visto que podem ser realizados entre 25 e 30
483 dias pós-inseminação, enquanto a palpação retal geramente é realizada por volta dos 40 dias
484 (Lucy et al., 2011). Essa diferença de 15 dias pode causar perda da ordem de US\$ 4,734.90
485 considerando-se 52,5% de taxa de prenhez pós-IATF na simulação mencionada
486 anteriormente, visto que o atraso de 22 dias na concepção em bovinos pode causar prejuízos
487 da ordem de US\$ 6,944.52, onde: 22 dias x 0,5kg/ganho de peso do(a) bezerro(a)/dia = 11kg;
488 US\$ 1.20/kg de bezerro(a) x 11kg = US\$ 13.23 x 525 bezerros(as) = US\$ 6,943.52 (Torres et
489 al., 2009).

490 Complementar a isso, o aumento de 95% para 97,5% da sensibilidade e especificidade
491 em um método de diagnóstico de gestação pode causar um incremento na lucratividade de
492 US\$ 0.10 a 4.70 por vaca (Oltenucu et al., 1990). Posteriormente De Vries et al. (2005)
493 também descreveram que uma redução de 98% para 92% na sensibilidade e especificidade do
494 método de diagnóstico de gestação causando prejuízo de US\$ 0.10 a 0.20 por vaca por ano.

495 Percebe-se também que os custos de realização do exame sonográfico e da
496 determinação de ELISA-PAG não diferiram muito quando foi considerado o valor praticado
497 para pequenos rebanhos. Todavia, utilizando o valor do produto comercializado pelo

498 fabricante, o diagnóstico de gestação pelo ELISA-PAG é praticamente metade daquele da
499 ultrassonografia. Além disso, o ELISA-PAG demonstrou-se mais vantajoso para o
500 diagnóstico precoce da gestação que a ultrassonografia dada à simplicidade de execução e
501 maior precocidade do diagnóstico (25 dias) que a ultrassonografia (30 dias).

502

503

504 **4 Conclusão**

505

506 O ELISA-PAG demonstrou-se mais sensível e tão específico quanto à ultrassonografia
507 no período estudado, com alta acurácia especialmente na identificação de fêmeas não
508 gestantes, podendo ser utilizado com segurança a partir do 25º dia após a IATF para obtenção
509 precoce do diagnóstico de prenhez em fêmeas zebuínas.

510

511 **Referências**

512

513 Abdulkareem, T.A., Al-Sharifi, S.A.M., Ishak, M.A., Eidan, S.M., Alnimer, M.A., Passavant,

514 C.W., Branen, J.R., Sasser, R.G., 2011. Early pregnancy detection of Iraqi riverine

515 buffalo (*Bubalus bubalis*) using the BioPRYN enzyme-linked immunosorbent assay for516 PSPB and the progesterone assay. *Reprod. Domest. Anim.* 46, 455–462.

517 Barros, B.J.P., Visintin, J.A., 2001. Controle ultra-sonográfico de gestações, de mortalidades

518 embrionárias e fetais e do sexo de fetos bovinos zebuínos. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*

519 38, 74-79.

520 DesCôteaux, L., Gnemmi, G., Colloton, C., 2009. Ultrasonography of bovine female genital

521 tract. *Vet. Clin. Food Anim.* 25, 733-752.

522 De Vries A., Bartolome J., Broaddus B., 2005. What is Early Pregnancy Diagnosis Worth?

523 *Proceedings 2nd Florida Dairy Road Show*, 31-40.

524 Gradela, A., Daniel, T., Carneiro, T., Valin, D., 2009. Exatidão da ultra-sonografia para

525 diagnóstico de gestação aos 28 dias após inseminação e sua contribuição na eficiência

526 reprodutiva em fêmeas Nelore e cruzadas. *Rev. Port. Ciên. Vet.* 104, 31-35.

527 Green, J.C., Volkmann, D.H., Poock, S.E., Mcgrath, M.F., Ehrhardt, M., Moseley, A.E., Lucy,

528 M.C., 2009. Technical note: A rapid enzyme-linked immunosorbent assay blood test for

529 pregnancy in dairy and beef cattle. *J. Dairy Sci.* 92, 3819–3824.

530 Green, J.A., Parks, T.E., Avalle, M.P., Telugu, B.P., Mclain, A.L., Peterson, A.J., Mcmillan,

531 W., Mathialagan, N., Hook, R.R., Xie, S., Roberts, R.M., 2005. The establishment of an

532 ELISA for the detection of pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) in the serum of

533 pregnant cows and heifers. *Theriogenology* 63, 1481–1503.

- 534 Houghton, P.L., Lemenager, R.P., Horstman, L.A., Hendrix, K.S., Moss, G.E., 1990. Effects
535 of body composition, pre- and postpartum energy level and early weaning on reproductive
536 performance of beef cows and preweaning calf gain. *J. Anim. Sci.* 68:1438-1446.
- 537 Karen, A.M., Darwish, S., Ramoun, A., Tawfeek, K., Hanh, N.V., Sousa, N.M., Sulon, J.,
538 Szanci, O., Beckers, J.F., 2011. Accuracy of transrectal palpation for early pregnancy
539 diagnosis in Egyptian buffaloes. *Trop. Anim. Health Prod.* 43, 5–7.
- 540 Karen A., Darwish S., Ramoun A., Tawfeek, K., Van Hanh, N., Sousa, N.M., Sulon, J.,
541 Szenci, O., Beckers, J.F., 2007. Accuracy of ultrasonography and pregnancy-associated
542 glycoprotein test for pregnancy diagnosis in buffaloes. *Theriogenology*, 68, 1150–1155.
- 543 Kastelic, J.P., Curran, S., Pierson, R.A., Ginther, O.J. Ultrasonic evaluation of the bovine
544 conceptus., 1988. *Theriogenology*, 29, 39-54.
- 545 Lucy, M., Green, J., Pook, S., 2011. Pregnancy determination in cattle: A review of available
546 alternatives. *Proceedings, Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle*. Joplin, MO,
547 August 31 – September 1, 2011.
- 548 Nebraska Veterinary Diagnostic Laboratory. Disponível em: <http://vbms.unl.edu/nvlds>.
549 Acesso em: 08/03/2012.
- 550 Oltenacu, P.A., Ferguson, J.D., Lednor, A.J., 1990. Economic evaluation of pregnancy
551 diagnosis in dairy cattle: a decision analysis approach. *J. Dairy Sci.*, 73, 2826-2831.
- 552 Piechotta, M., Bollwein, J., Friedrich, M., Heilkenbrinker, T., Pssavante, C., Brane, J., Sasser,
553 G., Hoedemaker, M., Bollwein, H., 2011. Comparion of comercial ELISA Blood tests for
554 eary pregnancy detection in dairy cows. *J. Reprod. Devel.* 57, 1. 72-75.
- 555 Romano, J.E., Larson, J.E., 2010. Accuracy of pregnancy specific protein-B test for early
556 pregnancy diagnosis in dairy cattle. *Theriogenology* 74, 486–493.

- 557 Romano, J.E., Thompson, J.A., Forrest, D.W., Westhusin, M.E., Tomaszewski, M.A.,
558 Kraemer, D.C., 2006. Early pregnancy diagnosis by transrectal ultrasonography in dairy
559 cattle. *Theriogenology* 66, 1034–1041.
- 560 Real, L.M.M., Valencia, G.L., Corral, A., Rentenia, T., 2006. Evaluation of ultrasound for
561 pregnancy diagnosis between 20 and 40 days post insemination in dairy cows. *J Ani Vet*
562 *Adv.* 5, 11, 949-951.
- 563 Sousa, N. M. Purificação, caracterização e dosagem radiológica de glicoproteínas associadas à
564 gestação em zebuínos., 2002. 375f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) -
565 Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- 566 Sousa, N.M., Garbayo, J.M., Figueiredo, J.R., Sulon, J., Gonçalves, P.B.D., Beckers, J.F.,
567 1999. Pregnancy-associated glycoprotein and progesterone profiles during pregnancy and
568 postpartum in native goats from the north-east of Brazil. *Small Rum Res.* 32, 137-147.
- 569 Szenci, O., Beckers, J.F., Humblot, P., Sulon, J., Sasser, G., Taverne, M.A.M., Varga, J.,
570 Baltusen, R., Schekk, G., 1998. Comparison of ultrasonography, bovine pregnancy-
571 specific protein B, and bovine pregnancy-associated glycoprotein 1 test for pregnancy
572 detection in dairy cows. *Theriogenology* 50, 77-88.
- 573 Szenci, O., Gyulai, G.Y., Nagy, P., Kovhcs, L., Varga, J., Taverne, M.A.M., 1995. Effect of
574 uterus position relative to the pelvic inlet on the accuracy of early bovine pregnancy
575 diagnosis by means of ultrasonography. *Vet. Quart*, 17, 37-39.
- 576 Torres-Júnior, J.R.S., Melo, W.O., Elias, A.K.S., Rodrigues, L.S., Penteadó, L., Baruselli,
577 P.S., 2009. Considerações técnicas e econômicas sobre reprodução assistida em gado de
578 corte. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 33, 1, 53-58.