

EDIVÂNIA MARIA DE FREITAS

**UTILIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS ASSOCIADAS À GESTAÇÃO
COMO MÉTODO DE DIAGNÓSTICO PRECOCE EM VACAS
LEITEIRAS DA RAÇA GIROLANDO**

Recife

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO–UFRPE
PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E REPRODUÇÃO DE
RUMINANTES – PGRSS

EDIVÂNIA MARIA DE FREITAS

UTILIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS ASSOCIADAS À GESTAÇÃO
COMO MÉTODO DE DIAGNÓSTICO PRECOCE EM VACAS
LEITEIRAS DA RAÇA GIROLANDO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Sanidade e Reprodução de Ruminantes.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro

Recife

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO – UFRPE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E REPRODUÇÃO DE RUMINANTES – PGSRR

UTILIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS ASSOCIADAS À GESTAÇÃO COMO MÉTODO DE DIAGNÓSTICO PRECOCE EM VACAS LEITEIRAS DA RAÇA GIROLANDO

**Dissertação elaborada por
EDIVÂNIA MARIA DE FREITAS**

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro

Presidente da Banca / Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns

Prof. Dr. Wilton Pinheiro Júnior

DMV – Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. André Mariano Batista

PNPD – Reprodução Animal - UFRPE

*Com toda expressão de amor, dedico este
trabalho à minha filha Maria Laura..*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, Nosso Pai, pela sua infinita misericórdia, amor e justiça. E por sempre me conceder mais do que eu mereço.

À minha mãe, dona Maria Inácia de Freitas e ao meu pai, seu José Cassimiro de Freitas (Zé Camelo), tão somente agradeço. Pelo amor incondicional, pela vida de muita luta e trabalho, pela coragem de sempre enfrentar as adversidades da vida, sustentada na fé e na esperança de dias melhores. Pelo exemplo de seres humanos simples e honestos que são.

Aos meus irmãos Edvaldo Cassimiro de Freitas (*in memoriam*), Ednaldo Cassimiro de Freitas e Edjalma Cassimiro de Freitas, obrigada por serem tão diferentes um do outro, pelas “arengas” e pela amizade que temos.

Agradeço também à minha sobrinha Bruna Andrade Freitas (Teh), por ter uma sobrinha-irmã, que sempre torce por mim e que pude confidenciar muitas histórias e posso contar ainda hoje. Por me fazer dar inúmeras gargalhadas quando nos encontramos e por ter se tornado também um exemplo de mulher determinada, inteligente e humana.

Agradeço ao meu esposo, companheiro, amigo, amor e confidente, José Augusto Tenório de Sousa Bernardo, por hoje sermos uma família, cheia de sonhos, fé e interesses comuns.

Aos meus amigos, sejam próximos ou distantes, agradeço pelo respeito, apoio e carinho. Pelos momentos de alegria e pelo que pude aprender com vocês.

Aos meus professores de vida acadêmica, agradeço a contribuição e os ensinamentos. E não poderia deixar de listar alguns nomes que para minha escolha e atuação profissional foram de suma importância: Prof^a Dr^a Taciana Rabelo, Prof. Dr. Wilton Júnior, Prof. Dr. Cláudio Coutinho e Prof. Dr. Daniel Brandespin.

E com muito respeito, admiração e imenso carinho, meus agradecimentos ao professor e orientador Dr. Gustavo Ferrer Carneiro, por ter aberto as portas para mim e me aceitado como orientada, por seu dom de ensinar, e principalmente, por sua preocupação em gerar oportunidades.

À equipe do LABRAPE, obrigada pela presteza e contribuição para a realização dessa pesquisa. Em especial ao meu colega Breno Santana e Izabela Lira.

À Clínica de Bovinos de Garanhuns, meu eterno agradecimento. Seus princípios e ensinamentos perpetuam em minha vida profissional.

À fazenda Várzea Alegre, e toda equipe de profissionais que ali atuam, dentre eles meus sinceros agradecimentos à Jaqueline Capito (zootecnista) e ao meu colega Médico Veterinário Itamar Torquato.

Ao Sr. Dr. Otávio Bezerra do Rego Barros, sócio-proprietário e gestor da fazenda Várzea Alegre e grupo Rancho Alegre, meus sinceros respeito e agradecimento por sempre abrir as portas e contribuir para o desenvolvimento da pesquisa e extensão.

Em suma, a todos que fizeram e fazem parte de minha jornada profissional, direta e indiretamente, vos agradeço.

“Se eu nascesse de novo e pudesse
escolher... Mais do que sou, eu não queria
ser.” (Luiz Gonzaga)

RESUMO

A cadeia produtiva de leite no Brasil é bastante difundida em toda extensão territorial, e quando se trata de sistemas de produção que visem aumentar a produtividade no setor, as técnicas intensivas de reprodução animal devem majoritariamente fazer parte dessa integração. Onde nesse contexto tudo se inicia a partir do diagnóstico de gestação da fêmea leiteira. Diante desta abordagem, objetivou-se com este estudo utilizar as Proteínas Associadas À Gestação (PAG's) como método de diagnóstico precoce de gestação em vacas leiteiras da raça Girolando. Para o experimento foi utilizado o kit comercial VISUAL-PAG do "IDEXX Laboratories" (Inc., Westbrook, Maine, USA), um teste de reação colorimétrica, cuja mudança visual na cor determina o resultado. Apesar da recomendação do fabricante indicar para uso em vacas a partir do 28º dia pós-serviço, neste estudo buscou-se determinar a sensibilidade e especificidade do teste nos dias 25, 26, 27 e 28 pós-Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF). Para tanto, foram utilizadas 57 fêmeas multíparas em iguais condições de manejo e cada animal foi submetido a quatro coletas sequenciais de amostras de sangue nos dias descritos. O material biológico coletado foi obtido através de venopunção dos vasos coccígenos por meio de agulhas e tubos de vácuo sem anti-coagulante, e após retração do coágulo seguiu-se o processo de centrifugação por 10 minutos a 900g e formação de alíquotas devidamente identificadas e armazenadas a – 20°C para posterior análise. Aos 32 dias da IATF todas as fêmeas foram submetidas ao diagnóstico de gestação por ultrassonografia (US) realizada por profissional capacitado. Sendo este considerado o teste padrão (Ouro) do experimento. Os resultados foram obtidos através de um estudo de concordância, onde revelou uma sensibilidade de 100% e especificidade de 94,7% iguais para os dias 25, 26, 27 e 28 pós-IATF. Diante destes resultados pode-se considerar que a pesquisa das PAG's através do kit VISUAL pode ser utilizada como um método de diagnóstico precoce de gestação e seguro em vacas leiteiras da raça Girolando aos 25 dias pós-inseminação artificial.

Palavras chave: PAG's, Girolando, diagnóstico.

ABSTRACT

The milk production chain in Brazil is very widespread in all territorial extension, and when it comes to production systems that aim to increase productivity in the sector, intensive animal reproduction techniques must primarily be an important part of this integration. In this context, everything starts from the diagnosis of pregnancy of the dairy cow. In view of this approach, the aim of this study was to use the proteins associated with pregnancy (PAG's) as a method for early diagnosis of pregnancy in Girolando dairy cows. For the experiment the VISUAL-PAG commercial kit from IDEXX Laboratories (Inc., Westbrook, Maine, USA) was used, a colorimetric reaction test, whose visual color change determines the result. Despite of the manufacturer's recommendation to be used in cows from the 28th post insemination day, this study aimed to determine the sensitivity and specificity of the test at 25, 26, 27 and 28 days post-Timed Artificial Insemination (TAI). For this, 57 multiparous females were used in equal management conditions, and each animal was submitted to four sequential collections of blood samples on the days described. The biological material collected was obtained by venipuncture of the coccidian vessels through needles and vacuum tubes without anticoagulant, and after clot retraction followed by the centrifugation process for 10 minutes at 900g for better use of serum and blood formation of aliquots properly identified and stored at -20°C for further analysis. At 32 days of TAI all females were submitted to pregnancy diagnosis by ultrasonography (US) performed by a skilled professional. This is considered the Gold Standard Test of the experiment. The results were obtained through a concordance study, which revealed a sensitivity of 100% and specificity of 94.7% for days 25, 26, 27 and 28 post-TAI. In view of these results, it can be considered that the research of the PAGs through the VISUAL kit can be used as a diagnostic method of early and safe gestation in dairy cows of the Girolando breed 25 days after artificial insemination.

Key words: PAGs, Girolando, Pregnancy, Diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Coleta de sangue dos vasos coccígenos.....	32
Figura 2. Identificação das amostras.....	32
Figura 3. Composição do kit VISUAL: controle negativo (a); controle positivo (b); solução detectora de PAG (c); Peroxidase de raiz forte (d); substrato TMB (e); solução interruptora (f).....	33
Figura 4. Resultados das reações das amostras na placa de microtitulação do Kit- VISUAL.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Avaliação da Sensibilidade e Especificidade do kit VISUAL-PAG, onde Kappa: 0,00- 0,20 = concordância fraca; 0,21 - 0,40 = regular; 0,41 - 0,60 = moderada; 0,61 - 0,80 = boa; 0,81- 1,00 = muito boa, valores negativos são interpretados como equivalentes a 0,00.**34**

LISTA DE ABREVIATURAS

BE – Benzoato de estradio

I.A – Inseminação artificial

P4 - Progesterona

PGF2 α - Prostaglandina

IATF – Inseminação artificial em tempo fixo

i.m – Intra-muscular

PAG – Proteínas associadas a gestação

ELISA - Enzyme linked immunosorbent assay

RIA - Radio-imunoensaio

US – Ultrassonografia

UAG – Unidade Acadêmica de Garanhuns

CBG – Clínica de Bovinos de Garanhuns

CENLAG – Central de Laboratórios de Garanhuns

TMB – Tetrametibenzina

C+ - Controle positivo

C- - Controle negativo

A – Animal

C – Coleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos	18
3. REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 Reconhecimento Materno da Gestação	19
3.2 Diagnóstico de Gestação em Vacas.....	20
3.3 Glicoproteínas Associadas à Gestação	21
4. REFERÊNCIAS	24
5. ARTIGO CIENTÍFICO	28

1. INTRODUÇÃO

A cada ano a atividade leiteira tem se tornado mais especializada e exigente (MORAES, 2013). A produção mundial de leite se concentra em países com maior índice de desenvolvimento tecnológico e financeiro, o que insere o Brasil como 5º maior produtor, com cerca de 35 bilhões de litros, o equivalente a 5,28% da produção mundial. Nos estados do Nordeste a produção entorna 3,8 bilhões, com acréscimo do volume de 290 milhões, destacando Pernambuco como o estado que mais contribuiu para este incremento com 95 milhões de litros de leite produzidos (IBGE, 2015).

A eficiência reprodutiva de um rebanho é um dos componentes mais importantes no desempenho econômico de uma propriedade de produção de leite (LEITE, 2001). Utilizando os índices reprodutivos e produtivos como indicadores de desempenho é possível antecipar, calcular, organizar e melhorar os eventos ligados à reprodução (TORRES JUNIOR et al., 2009). Por sua vez, a não observação destes indicadores elevaria o número de vacas improdutivas dentro do rebanho, bem como as despesas para manutenção destas, comprometendo economicamente a atividade (BARBOSA et al., 2011).

O diagnóstico de gestação na bovinocultura de leite constitui-se numa ferramenta estratégica no manejo geral de uma propriedade, onde o conhecimento da existência ou não de gestação possibilita a tomada de decisões, as quais podem afetar diretamente os índices de produtividade com reflexos econômicos imediatos (NEVES et al., 2002).

Associado ao uso de biotécnicas, o diagnóstico precoce da gestação torna-se uma valiosa técnica para o incremento da eficiência reprodutiva, pois possibilita tanto a adoção de um manejo adequado das fêmeas prenhes, quanto à ressincronização e reinseminação de fêmeas não gestantes o mais cedo possível (GRADELA et al., 2009; GREEN et al., 2011).

As glicoproteínas associadas à prenhez (Pregnancy-Associated Glycoprotein – PAG`s) tem sido descritas como um bom marcador da gestação e da viabilidade fetal, com concentrações em ascendência no sangue materno a partir do 22º dia até a última semana de gestação (ABDULKAREEM et al., 2012).

Testes comerciais vêm sendo utilizados em pesquisas para detecção de PAG em mamíferos como o VISUAL-PAG (IDEXX VISUAL pregnancy test) que permite uma leitura dos resultados através da coloração das amostras de soro sanguíneo na própria placa de microtitulação, podendo ser aplicado em condições de campo, ou por meio do ELISA-

PAG (IDEXX ELISA Pregnancy test), devendo este ser realizado no aparato laboratorial (CHAVES, 2016).

A detecção precoce de prenhez em vacas de leite é um componente essencial em atuais programas de gestão reprodutiva, possibilitando encurtar o intervalo entre partos e maximizar a produção leiteira (COMMUN et al., 2016).

Green et al (2009) demonstraram em estudo que vacas e novilhas taurinas leiteiras avaliadas entre 25-45 pós Inseminação Artificial (IA) e taurinas de corte avaliadas entre 29-56 dias pós-IA demonstraram concentrações de PAG semelhantes e aceitáveis no diagnóstico precoce de gestação em bovinos. Todavia, estudo mais recente realizado por Mercadante et al (2013) revelou que as concentrações de PAG podem sofrer variações nas concentrações circulantes no soro materno em razão das diferenças entre raças de bovinos. Contudo, nenhum estudo ainda demonstrou a acurácia do kit VISUAL-PAG como método precoce de diagnóstico aos 25 dias pós-IATF em fêmeas leiteiras da raça Girolando.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar a eficácia da utilização das PAG's como método de diagnóstico precoce de gestação em vacas leiteiras da raça Girolando.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar a sensibilidade e especificidade do VISUAL-PAG Idexx (Pregnancy Test) para o diagnóstico precoce de gestação em vacas de leite da raça Girolando aos 25º, 26º, 27º e 28º dia pós IATF;
- Comparar os resultados das PAG's para o diagnóstico precoce de gestação em bovinos de leite da raça Girolando frente à utilização da ultrassonografia (teste ouro).

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Reconhecimento Materno da Gestação

O estabelecimento da gestação provoca no organismo materno uma série de alterações de caráter hormonal, anatômico e comportamental (NEVES et al., 2002). De acordo com Cavalcante et al (2001), o período gestacional dentro de um padrão de normalidade para espécie bovina limita-se de 275 a 305 dias. Jainudeen e Hafez (2004) acrescentam que sua duração pode ser geneticamente determinada, mas também, modificada por fatores materno-fetais e ambientais. Todavia, seu início é marcado por processos que prolongam o período funcional do corpo lúteo cíclico, sugerindo a existência de um reconhecimento materno gestacional.

Em 1969, Roger Short, definiu a expressão “reconhecimento materno da gestação” como o mecanismo pelo qual o concepto sinaliza sua presença à unidade materna, prolongando a vida do corpo lúteo e mantendo a gestação através de interações bioquímicas que ocorrem entre o concepto e o tecido endometrial nas diversas espécies de mamíferos (SPENCER e BAZER, 2004). Tais interações resultam no bloqueio da luteólise e na manutenção da secreção de progesterona pelo corpo lúteo (MARQUES et al., 2007). No aparelho reprodutivo da fêmea a progesterona tem a função de regular a duração do ciclo estral, promover o relaxamento do miométrio, estimular a proliferação de células endometriais e manter no útero as condições necessárias para o desenvolvimento do concepto (BERTAN et al., 2006). Mantendo seus níveis circulantes constantes durante toda a gestação da vaca (JAINUDEEN e HAFEZ, 2004).

Durante diversos estudos que permearam as décadas de 70 a 90, evidenciou-se que os mecanismos sinalizadores entre o concepto e o tecido endometrial que retardavam a luteólise ocorriam por meio de uma proteína sintetizada pelas células trofoblásticas do blastocisto, denominada interferon-tau (MARQUES et al., 2007; NEVES et al., 2008). O mecanismo pelo qual o interferon-tau inibe a regressão do corpo lúteo é pela supressão da liberação pulsátil de prostaglandina (PGF 2α) endometrial (MARQUES et al., 2007). Entende-se que o mesmo atua de maneira parácrina no tecido materno, suprimindo a transcrição de genes para receptores de ocitocina e de estradiol no endométrio (SPENCER E BAZER, 1995).

De acordo com Demmers et al (2001) e Neves et al (2008) a medida que determinadas regiões do trofoblasto começam a estabelecer contato com o epitélio uterino,

ocorre um decréscimo na expressão de interferon-tau até que cesse sua produção pós completa implantação.

3.2 Diagnóstico de Gestação em Vacas

Na bovinocultura leiteira, o diagnóstico de gestação ajuda no manejo geral do rebanho, permitindo efetivar o controle reprodutivo das fêmeas dentro da propriedade (GONSALVES et al., 2002). Possibilitando realizar novas coberturas para as fêmeas que não emprenharam, reduzir o intervalo entre partos, diagnosticar problemas relacionados à fertilidade e programar o manejo alimentar diferenciado para fêmeas prenhes e não prenhes no terço final da gestação (MENEZES et al., 2011).

Dentre as diversas técnicas de diagnóstico de gestação em bovinos, a palpação transretal tem sido utilizada desde o início do século XX, e posteriormente, a partir da década de oitenta, o diagnóstico ultrassonográfico possibilitou detectar gestações em fases mais precoces (NEVES et al., 2002). Todavia, estes métodos dependem da detecção do conceito-feto, membranas e líquidos fetais (JAINUDEEN e HAFEZ, 2004), o que deve ser realizado por veterinário com relativa experiência na área, bem como o uso de equipamento especializado para realização do exame ultrassonográfico (LUCY et al., 2011).

A palpação retal é normalmente realizada entre o 40º e 45º dia pós-cobertura ou inseminação artificial (IA). Podendo ser executada em fases mais precoces que variam de 30 a 35 dias de gestação (ROMANO et al., 2007). Todavia, erros de diagnóstico por palpação retal podem ocorrer em razão de um conteúdo uterino não fisiológico, pós-parto precoce, sobreposição ruminal ou palpação de ovários confundidos por placentônios (GONÇALVES et al., 2002).

O diagnóstico de gestação por ultrassonografia é uma técnica não invasiva e não provoca modificações biológicas tanto ao paciente quanto ao operador (NEVES et al., 2008). A detecção precoce de prenhez em vaca por meio dessa técnica foi relatada por Descôteaux et al (2009), como rápida e segura a partir do 27º dia pós IA. Para Neves et al (2008), exames ecográficos realizados antes do 25º dia estão 50% mais susceptíveis a erros em relação aos feitos a partir dessa data, e que a eficiência da técnica dependerá da acurácia do equipamento, da experiência e habilidade do examinador, bem como do período gestacional.

Karen et al (2015) relatam que métodos envolvendo dosagens hormonais de progesterona e glicoproteínas associadas à prenhez (PAG's) em amostras de sangue ou leite vem sendo empregados como alternativa para diagnóstico precoce de gestação em bovinos.

Neves et al (2008) afirmam que vacas prenhes apresentam níveis de progesterona semelhantes aos de uma vaca na fase lútea do ciclo estral, indicando unicamente a presença de um corpo lúteo funcional e não necessariamente uma prenhez. Já as PAG's, segundo Telugu et al (2009), são sintetizadas e secretadas pelo tecido placentário, e, portanto, são indicadores diretos da gestação. Lucy et al (2011) acrescentam que as PAG's são mais estáveis ao longo do período gestacional, quando comparadas com outras substâncias como interferons e progesterona.

3.3 Glicoproteínas Associadas à Gestação

As glicoproteínas associadas à gestação (PAG's), também denominada proteína específica da gestação B (PSPB) são proteases aspárticas sintetizadas por células binucleadas do trofoblasto de ruminantes (XIE et al., 1997; WOODING et al., 2005). Xie et. al (1991), ao identificar o DNA complementar (cDNA) das PAG's bovina e ovina, possibilitou a identificação das sequências de aminoácidos e a constatação que ambas são estruturalmente muito semelhantes à pepsina que depende de dois ácidos aspárticos para realizar sua atividade catalítica. Porém, algumas PAG's são proteases inertes, ou seja, não apresentam capacidade de agirem como enzimas cataliticamente ativas, contudo desempenham função de peptídeos de ligação com especificidades na interface feto-maternal (TELUGU et al., 2009).

As PAG's aparecem no sangue materno logo após o processo de implantação (RANILLA et al., 1994). Ao se expandir pelo tecido endometrial, as células binucleadas trofoblásticas secretam PAG continuamente durante toda gestação (WOODING et al., 2005). Sua presença, portanto, indica a existência de uma placenta funcional e viabilidade embrionária (ZOLI et al., 1992; KAREN et al., 2007).

As concentrações de PAG na circulação da fêmea bovina ocorrem no início da gestação até a 35ª semana, e estas vão aumentando gradativamente até o máximo de 250ng/mL. Entre a 35ª semana e a última semana da gestação, as concentrações de PAG crescem rapidamente e ocorre um pico com valor entre 1 a 5 µg/mL (ZOLI et al., 1992).

O desenvolvimento de anticorpos monoclonais específicos para PAG produzidos durante as fases iniciais da gestação permite o uso de imunoenaios como ELISA para a detecção precoce de gestação que pode ser realizada em vacas após 60 dias do parto (SILVA et al., 2007; GREEN et al., 2009). Giordano et al (2012) afirmam que um diagnóstico de prenhez antes dos 60 dias pós parto pode resultar num falso positivo em virtude dos níveis residuais de PAG's de gestação anterior.

Apesar da meia vida relativamente longa, essas proteínas placentárias apresentam decréscimo em seus níveis logo após a parição e diante de perda embrionária, sendo possível a detecção dessa perda quando se observa redução dos níveis de PAG em dosagens sequenciadas (GARBAYO et al., 2008).

Mercadante et al (2013) em estudo relataram que os animais *Bos indicus* apresentaram maiores concentrações de PAG no soro no início da gestação quando comparados aos animais *Bos taurus* com genética Angus. Além disso, Roberts et al (2015) observaram que os níveis de PAG no soro demonstraram ser afetados pela temperatura ambiente. E Patel et al (1995) indicaram que o tamanho e o número de fetos também são fatores influentes nas concentrações de PAG. Assim como o nível de produção de leite segundo Shahin et al (2014).

López-Gatius et al (2007) relataram pela primeira vez uma associação negativa entre os níveis plasmáticos de PAG e a produção de leite. Sendo essa associação negativa entre os níveis de PAG e a produção de leite não um resultado da diluição dos níveis de PAG no leite com o aumento da produção, e sim uma diminuição destes níveis à medida que a produção aumenta. Clemente et al (2009) explicam que vacas com maior produção de leite podem ter concentrações mais baixas de progesterona logo após a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) devido ao aumento do metabolismo hepático da progesterona, o que pode inibir o crescimento do embrião, levando a uma diminuição da produção de PAG.

Ricci et al (2015) observaram em estudo que os níveis plasmáticos de PAG em vacas gestantes foram negativamente correlacionados com a produção de leite tanto em vacas primíparas quanto multíparas. Da mesma forma os autores observaram nas análises de PAG no leite.

Em experimento realizado por Karen et al (2015), com objetivo de avaliar a precisão de um teste ELISA-PAG e radioimunoensaio (RIA-PAG) para diagnóstico de prenhez de vacas leiteiras da raça Holandesa no dia 28 pós inseminação artificial, considerando a ultrassonografia (TRUS) como padrão ouro do teste, verificou-se uma

sensibilidade de 92,7%, 90,2% e 100% para o TRUS, ELISA-PAG e RIA-PAG respectivamente. Enquanto que a especificidade dos três testes correspondeu a 91,5%, 98,3% e 94,4% respectivamente.

No estudo de Bragança et al (2012) utilizando 130 vacas zebuínas, foram avaliadas a sensibilidade e especificidade entre as técnicas de ELISA de leitura óptica e a ultrassonografia transretal, por meio do Bovine Pregnancy Test (Idexx Laboratories) para determinação das PAG's aos 25 e 28 dias pós inseminação artificial em tempo fixo (IATF). O método ELISA apresentou sensibilidade de 100% para o dia 25, bem como para o dia 28 pós IATF, contra 62,50% e 93,18%, respectivamente, obtidos pela ultrassonografia.

4. REFERÊNCIAS

- 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.
- BARBOSA, C.F.; JACOMINI, J.O., DINIZ, E.G., SANTOS, R.M., TAVARES, M. Inseminação artificial em tempo fixo e diagnóstico precoce de gestação em vacas leiteiras mestiças. **R. Bras. Zootec.**, v.40, n.1, p.79-84, 2011.
- BERTAN, C. M.; BINELLI, M.; MADUREIRA, E. H.; TRALDI, A. S. Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, São Paulo, v. 43, n. 6, p. 824-840, 2006.
- BRAGANÇA, G.M.; VIANA, R.B.; CAMPELLO, C.C.; ZIMMERMAN, S.O.; OLIVEIRA, W.M.; CAMPOS, D.S.; MEDEIROS, R.L.F. Diagnóstico precoce de gestação em vacas zebuínas pela detecção de glicoproteínas associadas à prenhez. 37 66f. **Dissertação** (Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2012.
- CAVALCANTE, F.A.; MARTINS F.R.; CAMPELLO, C.C.; LOBO, R.N.B.; MARTINS, G.A. Período de gestação em rebanho nelore na Amazônia Oriental. **Rev. bras. zootec.**, 30 (5):1451-1455, 2001.
- CHAVES, C. M. S. Teste imunoenzimático visual para detecção de glicoproteínas associadas à prenhez em ovelhas 66p. **Dissertação** (Mestrado em produção animal sustentável) – Instituto de Zootecnia, Nova Odessa, 2016.
- CLEMENTE, M.; J. DE LA FUENTE, T.; FAIR, A. AL NAIB; A. GUTIERREZ-ADAN, J. F. ROCHE. 2009. Progesterone and conceptus elongation in cattle: A direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium. **Reproduction**: 138:507–517.
- COMMUN, L.; VALEK, K.; BARBRY, JEAN-B; SAN PUN; RICE, A.; MESTEK, A.; EGLI, C.; LETERME, S. Detection of pregnancy-associated glycoproteins in milk and blood as a test for early pregnancy in dairy cows. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** 1-7.DOI: 10.1177/1040638716632815 jvdi.sagepub.com. 2016.
- DEMMERS, K.J.; DERECKA, K.; FLINT, A. Trophoblast interferon and pregnancy. *Reproduction*: 121, 41–49. School of Biosciences, University of Nottingham, Sutton Bonington Campus, Loughborough, Leicestershire LE12 5RD, UK; and 2Institute of **Animal Reproduction** and Food Research of the Polish Academy of Sciences. 2001.
- DESCÔTEAUX, L.; GNEMMI, G.; COLLOTON, C. Ultrasonography of bovine female genital tract. **Veterinary Clinics Food Animal**, v.25, p.733-752, 2009.
- 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.

GIORDANO, J.O.; GUENTHER, J.N.; LOPES JR., G.; FRICKE, P.M. Changes in serum pregnancy-associated glycoprotein, pregnancy-specific protein B, and progesterone concentrations before and after induction of pregnancy loss in lactating dairy cows. **J Dairy Sci** 2012;95:683–697.

GONSALVES P.B.D.; FIGUEIREDO JR. Freitas V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 1.ed. São Paulo: Varela, 2002. 01p.

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 Diagnóstico precoce de gestação em vacas zebuínas utilizando a detecção de glicoproteínas associadas à prenhez reprodutiva em fêmeas Nelore e cruzadas. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.104, p.31-35, 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.

GREEN, J. C., D. H. VOLKMANN, S. E. POOCK, M. F. MCGRATH, M. EHRHARDT, A. E. MOSELEY, AND M. C. LUCY. Technical note: A rapid enzyme-linked immunosorbent assay blood test for pregnancy in dairy and beef cattle. **J. Dairy Sci.** 92:3819–3824 .2009.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Pecuária Municipal 2015, v. 39, p.1-63, 2015. **Acesso em:** out/2016. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>

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.

KAREN, Aly et al. Comparison of a commercial bovine pregnancy-associated glycoprotein ELISA test and a pregnancy-associated glycoprotein radiomimmunoassay test for early pregnancy diagnosis in dairy cattle. **Animal reproduction science**, v. 159, p. 3137, 2015.

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.

LEITE, T. E.; MORAES, J.C.F.; PIMENTEL, C. A. Eficiência produtiva e reprodutiva em vacas leiteiras. **Revista Ciência Rural**. Santa Maria, Pelotas, v.31, n.3, pg. 467-472, 2001.

LÓPEZ-GATIUS, F., J. M. GARBAYO, P. SANTOLARIA, J. YANIZ, A. AYAD, N. M. DE SOUSA, AND J. F. BECKERS. Milk production correlates negatively with plasma levels of pregnancy-associated glycoprotein (PAG) during the early fetal period in high producing dairy cows with live fetuses. **Domest. Anim. Endocrinol.** 32:29–42. 2007.

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.

MARQUES, V.B.; BERTAN, C.M.; ALMEIDA, A.B.; MEIRELLES, F.V.; PAPA, P.C.; BINELLI, M. Interferon-tau e o reconhecimento da gestação em bovinos. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.31, n.4, p.479-488, out./dez. 2007. Disponível em www.cbra.org.br

MENEZES, M.C.; LÉGA, E.; COELHO, L. A. F. Utilização da ultrassonografia por via transretal em vacas da raça girolando para acompanhamento do desenvolvimento embrionário e/ ou fetal 26 a 181 dias de gestação. **Nucleus Animalium**, v.3,n.1,maio 2011. DOI: 10.3738/1982.2278.492.

MERCADANTE, P. M. et al. Subspecies differences in early fetal development and plasma pregnancy-associated glycoprotein concentrations in cattle. *Journal of animal science*, v. 91, n. 8, p. 3693-3701, 2013. Nebel, R. L. 1988. On farm milk progesterone tests. **Journal of Dairy Science**. 71:1682–1690.

MORAES, F. Análise da rentabilidade de sistemas de produção de leite participantes no programa “Balde Cheio” no estado do Rio de Janeiro. 2013. 279p. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Federal de Lavras.

NEVES, J.P.; OLIVEIRA, J.F.C.; MACIEL, M. N. Diagnóstico de gestação em bovinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, J.V. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Varela, p.01-13, 2002. Cap 1.

NEVES, J.P.; OLIVEIRA, J.F.C.; FREITAS, V.J.F.; SIMPLÍCIO, A.A.; TEIXEIRA, D.I.A; ALMEIDA, J.L. Diagnóstico de prenhez em ruminantes. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, J.V. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Varela, p.17--32, 2008. Cap 1.

PATEL, O. V., I. DOMEKI, N. SASAKI, T. TAKAHASHI, M. HIRAKO, R. G. SASSER, AND P. HUMBLLOT. Effect of fetal mass, number and stage of gestation on pregnancy specific protein B concentrations in the bovine. **Theriogenology** 44:827–833.1995.

RANILLA MJ, SULON J, CARRO MD, MANTECON AR, BECKERS JF,: Plasmatic profiles of pregnancy-associated glycoprotein and progesterone levels during gestation in Churra and Merino sheep. **Theriogenology** 42, 537–545. 1994.

RICCI , P. D.; CARVALHO , M. C.; AMUNDSON , R. H.; FOURDRAINE, L.; VINCENTI ; P. M. FRICKE. Factors associated with pregnancy-associated glycoprotein (PAG) levels in plasma and milk of Holstein cows during early pregnancy and their effect on the accuracy of pregnancy diagnosis Department of Dairy Science, University of Wisconsin–Madison, Madison - Department of Veterinary Science, **J.Dairy Sci**. 98 :1–13. 2015.

ROBERTS, J. N.; BYREM, T. M.; GROOMS, D. L. Application of an ELISA Milk Pregnancy Test in Beef Cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n. 4, p. 651658, 2015.

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.

SHAHIN, M.; FRIEDRICH, M; GAULY, M.; HOLTZ, W. Pregnancy-Associated Glycoprotein (PAG) Profile of Holstein–Friesian Cows as Compared to Dual-Purpose and Beef Cows. Department of Animal Science, Georg-August-University Goettingen, Goettingen, **Germany Reprod Dom Anim** 49, 618–620.2014.

SILVA, E., R. A. STERRY, D. KOLB, N. MATHIALAGAN, M. F. MCGRATH, J. M. BALLAM, AND P. M. FRICKE. Accuracy of a pregnancy associated glycoprotein ELISA to determine pregnancy status of lactating dairy cows twenty-seven days after timed artificial insemination. **J. Dairy Sci.** 90:4612–4622. 2007.

SPENCER, T.E e BAZER, F.W. Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. **Biol Reprod**, v.53, p.1527-1543, 1995.

SPENCER, T.E, BAZER, F.W. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. **Reprod Biol. Endocrinol**, v.2, p. 49, 2004.

TELUGU, B. P. V. L.; 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** 10:185. 2009.

TORRES JUNIOR, J.R.S., MELO, W.O., ELIAS, A.K.S., RODRIGUES, L.S., PENTEADO, L., BARUSELLI, P.S. Considerações técnicas e econômicas sobre reprodução assistida em gado de corte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.33, n.1, p.53-58, jan./mar, 2009.

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. 2005.

XIE S, GREEN J, BIXBY JB, SZAFRANSKA B, DEMARTINI JC, HECHT S, ROBERTS RM. The diversity and evolutionary relationships of the pregnancy-associated glycoproteins, an aspartic proteinase subfamily consisting of many trophoblast-expressed genes. **Proc Nat Acad Sci USA** 94, 12809–12816. 1997.

XIE S, LOW BG, KRAMER KK, NAGEL RJ, ANTHONY RV, ZOLI AP, BECKERS JF. ROBERTS RM. Identification of the major pregnancy-specific antigens of cattle and sheep as inactive members of the aspartic proteinase family. **Proc Nat Acad Sci USA**:88:10247-10251. 1991.

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

5. ARTIGO CIENTÍFICO

UTILIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS ASSOCIADAS À GESTAÇÃO (PAG'S - BOVINE PREGNANCY TEST IDEXX®) COMO MÉTODO DE DIAGNÓSTICO PRECOCE DE PREENHEZ EM VACAS LEITEIRAS DA RAÇA GIROLANDO

(Artigo a ser submetido à Revista: Ciência Animal Brasileira)

(Normas: Anexo A)

UTILIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS ASSOCIADAS À GESTAÇÃO COMO MÉTODO DE DIAGNÓSTICO PRECOCE EM VACAS LEITEIRAS DA RAÇA GIROLANDO

USE OF PROTEIN ASSOCIATED TO GESTATION AS AN EARLY DIAGNOSTIC METHOD IN DAIRY COWS OF THE GIROLANDO RACE

Edivânia Maria de Freitas^{1*}
Breno Barros de Santana¹
Isabela Lima¹
José Augusto T.S. Bernardo¹
Gustavo Ferrer Carneiro¹

¹ Unidade Acadêmica de Garanhuns – UAG, Garanhuns, PE, Brasil/ Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE/Pós-graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes – PGRSS

*Autor para correspondência – emf.vet@hotmail.com

Resumo

Objetivou-se com este estudo observar a eficácia da utilização das Proteínas Associadas À Gestação (PAG's) como método de diagnóstico precoce de gestação em vacas leiteiras da raça Girolando. Por meio de um teste de reação colorimétrica, recomendado para uso em vacas a partir do 28º dia pós-serviço, o VISUAL-PAG do "IDEXX Laboratories". Verificou-se a sensibilidade e especificidade do teste aos 25, 26, 27 e 28 dias pós-Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF), utilizando-se 57 fêmeas multíparas, submetidas a quatro coletas sequenciais de amostras de sangue nos dias descritos. O material foi coletado através de venopunção dos vasos coccígenos em tubos de vácuo sem anti-coagulante, processado e armazenamento a -20°C para posterior análise. Aos 32 dias da IATF todas as fêmeas foram submetidas ao diagnóstico de gestação por ultrassonografia (US), o teste padrão do experimento. Os resultados foram obtidos através de um estudo de concordância, onde revelou sensibilidade de 100% e especificidade de 94,7% iguais para os dias 25, 26, 27 e 28 pós-IATF. Diante destes resultados pode-se considerar que o kit VISUAL-PAG pode ser utilizado como um método de diagnóstico precoce e seguro de gestação em vacas leiteiras da raça Girolando aos 25 dias pós-inseminação artificial.

Palavras-chave: PAG's, Girolando, diagnóstico.

Abstract

The objective of this study was to observe the effectiveness of the use of proteins associated with pregnancy (PAG's) as a method of early pregnancy diagnosis in Girolando dairy cows. By using a colorimetric reaction test, recommended for use in cows from the 28th day after service, VISUAL-PAG from "IDEXX Laboratories". The sensitivity and specificity of the test were assessed at 25, 26, 27 and 28 days post-TAI, using 57 multiparous females submitted to four sequential collections of blood samples on the days described. The material was collected by venipuncture of the coccidian vessels in vacuum tubes without anti-coagulant, processed and stored at -20°C for later analysis. At 32 days of TAI all females were subjected to the diagnosis of pregnancy by ultrasonography (US), the Gold Test of the experiment. The results were obtained through a concordance study, which revealed 100% sensitivity and 94.7% specificity for days 25, 26, 27 and 28 post-TAI. In view of these results it can be considered that the VISUAL-PAG kit can be used as an early and safe method of early pregnancy diagnosis in Girolando dairy cows at 25 days after artificial insemination.

Key words: PAGs, Girolando, diagnosis.

Introdução

A cada ano a atividade leiteira tem se tornado mais especializada e exigente (MORAES, 2013). A produção mundial de leite se concentra em países com maior índice de desenvolvimento tecnológico e financeiro, o que insere o Brasil como 5º maior produtor, com cerca de 35 bilhões de litros, o equivalente a 5,28% da produção mundial. Nos estados do Nordeste a produção entorna 3,8 bilhões, com acréscimo do volume de 290 milhões, destacando Pernambuco como o estado que mais contribuiu para este incremento com 95 milhões de litros de leite produzidos (IBGE, 2015).

A eficiência reprodutiva de um rebanho é um dos componentes mais importantes no desempenho econômico de uma propriedade de produção de leite (LEITE, 2001). Utilizando os índices reprodutivos e produtivos como indicadores de desempenho é possível antecipar, calcular, organizar e melhorar os eventos ligados à reprodução (TORRES JUNIOR et al., 2009). Por sua vez, a não observação destes indicadores elevaria o número de vacas improdutivas dentro do rebanho, bem como as despesas para manutenção destas, comprometendo economicamente a atividade (BARBOSA et al., 2011).

O diagnóstico de gestação na bovinocultura de leite constitui-se numa ferramenta estratégica no manejo geral de uma propriedade, onde o conhecimento da existência ou não de gestação possibilita a tomada de decisões, as quais podem afetar diretamente os índices de produtividade com reflexos econômicos imediatos (NEVES et al., 2002). Associado ao uso de biotécnicas, o diagnóstico precoce da gestação torna-se uma valiosa técnica para o incremento da eficiência reprodutiva, pois possibilita tanto a adoção de um manejo adequado das fêmeas prenhes, quanto à ressincronização e reinseminação de fêmeas não gestantes o mais cedo possível (GRADELA et al., 2009; GREEN et al., 2011).

As glicoproteínas associadas à prenhez (Pregnancy-Associated Glycoprotein – PAG`s) tem 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 (ABDULKAREEM et al., 2012).

Testes comerciais vêm sendo utilizados em pesquisas para detecção de PAG em mamíferos como o VISUAL-PAG (IDEXX VISUAL pregnancy test) que permite uma leitura dos resultados através da coloração das amostras de soro sanguíneo na própria placa de microtitulação, podendo ser aplicado em condições de campo, ou por meio do ELISA-PAG (IDEXX ELISA Pregnancy test), devendo este ser realizado no aparato laboratorial (CHAVES, 2016).

A detecção precoce de prenhez em vacas de leite é um componente essencial em atuais programas de gestão reprodutiva, possibilitando encurtar o intervalo entre partos e maximizar a produção leiteira (COMMUN et al., 2016).

Green et al (2009) demonstraram em estudo que vacas e novilhas taurinas leiteiras avaliadas entre 25-45 pós Inseminação Artificial (IA) e taurinas de corte avaliadas entre 29-56 dias pós-IA demonstraram concentrações de PAG semelhantes no diagnóstico precoce de gestação em bovinos. Todavia, estudo mais recente realizado por Mercadante et al (2013) revelou que as concentrações de PAG podem sofrer variações nas concentrações circulantes no soro materno em razão das diferenças entre raças de bovinos.

Dentro desse contexto, objetivou-se com este estudo testar a eficácia e determinar a sensibilidade e especificidade do kit comercial VISUAL-PAG (IDEXX pregnancy test) em bovinos leiteiros da raça Girolando aos 25 dias pós-IATF.

Material e Métodos

O estudo foi conduzido numa propriedade de bovinos Girolando leiteiro com predominância $\frac{3}{4}$ de sangue. Situada na Microrregião do Vale do Ipojuca (08° 23' 56" latitude sul e 35° 03' 50" longitude oeste), dentro da Mesorregião do Agreste Pernambucano em parceria com o Laboratório de Reprodução Animal da Unidade Acadêmica de Garanhuns da UFRPE (UAG) e a Clínica de Bovinos de Garanhuns (CBG).

Foram selecionadas 57 fêmeas criadas em sistema de confinamento intensivo com cobertura de sombrites. Água e sal mineral *ad libitum*. E ração total processada à base de silagem de milho, cana-de-açúcar, palma forrageira, cevada, farelo de soja, milho triturado e caroço de algodão. Sendo a mistura fornecida três vezes ao dia diretamente no cocho e em quantidades correspondentes às exigências de produção dos animais.

Todas as vacas selecionadas para compor o experimento eram múltíparas e estavam em lactação, com média produtiva de 29kg/dia. sendo ordenhadas três vezes ao dia com intervalos de oito horas entre ordenhas. Previamente foram submetidas à avaliação clínica-ginecológica e selecionadas àquelas que estavam aptas a serem inseminadas e com mais de sessenta dias pós-parto.

A realização IATF procedeu-se a cargo do veterinário técnico da propriedade, realizada em quatro etapas compreendendo os meses de maio a julho de 2016. O protocolo de sincronização de cio instituído correspondia à administração intramuscular (i.m) de 2mg de benzoato de estradiol (BE) e colocação de dispositivo intravaginal impregnado com progesterona (P4) na concentração de 750mg no D0 (início do protocolo); no D8 retirava-

se o dispositivo de P4 e aplicava-se 150mcg de cloprostenol sódico (PGF₂α) por via i.m; no D9 administrava-se mais 1mg de BE i.m com a IATF realizada no D10 (48 horas após retirada da P4).

Foram realizadas coletas sequenciais de sangue de 57 animais nos dias 25, 26, 27 e 28 pós-inseminação, por meio de venopunção dos vasos coccígenos com agulhas e tubos de vácuo sem anti-coagulante mediante prévia assepsia local com álcool a 70% (Figura 1). O que gerou um total de 228 amostras. Anotou-se a numeração dos animais, bem como a numeração dos tubos, e após retração do coágulo seguiu-se o processo de centrifugação por 10 minutos a 900g. O soro obtido foi extraído por aspiração, transferidos para microtubos de polipropileno (ependorf), identificados e armazenados a - 20°C (Figura 2) para posterior análise na Central de Laboratórios de Garanhuns (CENLAG), Unidade Acadêmica de Garanhuns, da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

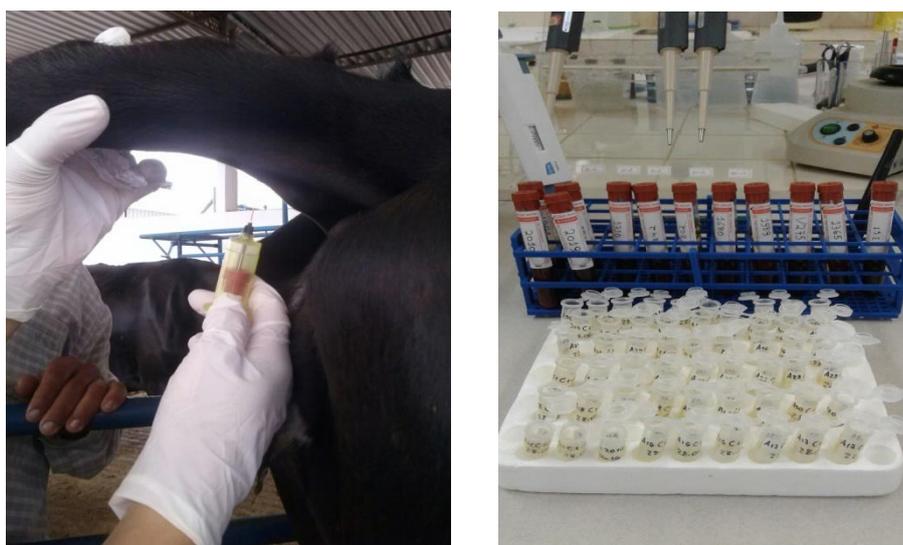


Figura 1: coleta de sangue dos vasos coccígenos. **Figura 2:** identificação das amostras

O diagnóstico de prenhez através das PAG's foi realizado por meio do *bovine pregnancy test idexx* - kit VISUAL (Figura 3). Recomendado pelo fabricante para uso em vacas a partir do 28º dia pós-serviço. O qual consiste num ensaio em placa de microtitulação, contendo controle negativo e positivo (Figura 3a e 3b). As amostras testadas (soro) e a solução detectora específica do anticorpo para PAG (Figura 3c) foram co-incubadas em poços revestidos com o anticorpo PAG. O anticorpo não ligado foi removido por lavagem com água destilada e um conjugado de peroxidase de raiz forte (Figura 3d) adicionado aos poços. O conjugado não ligado também passou pelo processo de lavagem e

o substrato de tetrametilbenzina (TMB) foi adicionado aos poços (Figura 3e). Sendo utilizada, ao final dos processos, a adição da solução interruptora (Figura 3f).



Figura 3: composição do kit VISUAL: controle negativo (a); controle positivo (b); solução detectora de PAG (c); Peroxidase de raiz forte (d); substrato TMB (e); solução interruptora (f).

As amostras foram distribuídas na placa de microtitulação em sentido vertical da esquerda para direita sempre no direcionamento norte-sul. Sendo os dois primeiros poços preenchidos com o controle negativo e positivo. Seguindo, então, a disposição das amostras nos poços subsequentes por animal em identificação numérica crescente de 1 a 57 e na sequência dos dias coletados: 1, 2, 3 e 4 a partir do 25º dia pós-IATF.

A leitura da placa após o processamento das amostras era realizada na observação da mudança de coloração do poço para a cor azul, determinando que o animal encontrava-se com prenhez positiva, já ausência da coloração definia os animais como não prenhes.

O teste padrão do experimento utilizado para comparar os resultados do ensaio foi realizado no 32º dia pós-IATF por meio de Ultrassonografia (US) realizada por profissional capacitado com aparelho Mindray modelo Dp 2200 vet, e probe ajustada para frequência de 5MHz. A fim de identificar os animais prenhes e não prenhes. Tendo como parâmetro para o diagnóstico positivo de gestação a visualização do concepto com presença de batimento cardíaco.

Para o estudo de concordância entre os testes utilizou-se o coeficiente de Kappa (K) e a interpretação convencional dos valores K adotadas foram: 0,00 - 0,20 = concordância fraca; 0,21 - 0,40 = regular; 0,41 - 0,60 = moderada; 0,61 - 0,80 = boa; 0,81 - 1,00 = muito boa, valores negativos são interpretados como equivalentes a 0,00 (Landis & Koch, 1977). Para o cálculo de concordância utilizou-se o programa computacional Bioestat versão 5.0.

Resultados

Os resultados obtidos através das amostras testadas nos poços do kit-VISUAL que apresentaram coloração azul foram interpretadas como prenhez positiva, já os poços com ausência de coloração foram interpretados como prenhez negativa (Figura 4).

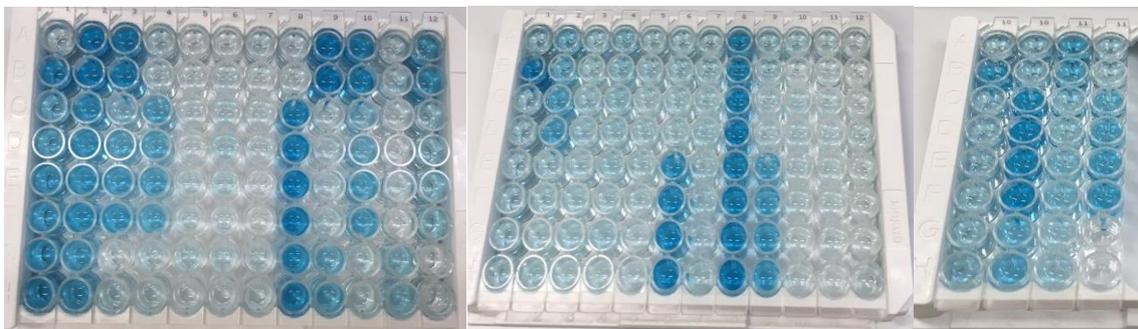


Figura 4: Resultados das reações das amostras na placa de microtitulação do Kit-VISUAL

Dos 57 animais testados para os dias 25, 26, 27 e 28 pós IATF, com base nesse método de diagnóstico, 21 apresentaram prenhez positiva e 36 animais foram considerados não prenhes para os dias testados. Já os resultados obtidos através do diagnóstico por US no 32º dia pós IATF: apenas dois dos 21 animais diagnosticados como prenhe através do Kit-VISUAL, foram negativo ao exame ultrassonográfico. E todos os animais diagnosticados como não prenhes através do Kit-VISUAL, foram também assim confirmados no diagnóstico por US. A sensibilidade e especificidade do teste para os dias 25, 26, 27 e 28 pós IATF foram similares e corresponderam a 100% e 94,7% respectivamente (Tabela 1).

DIA	USG/D32		SENS	ESP	Valor de p	Kappa
	Positivo	Negativo				
PAG/D25						
Positivo	19	2	100%	94,7%	<0,001	0,923
Negativo	0	36				
PAG/ D26						
Positivo	19	2	100%	94,7%	<0,001	0,923
Negativo	0	36				
PAG/ D27						
Positivo	19	2	100%	94,7%	<0,001	0,923
Negativo	0	36				
PAG/D28						
Positivo	19	2	100%	94,7%	<0,001	0,923
Negativo	0	36				

Tabela 1: Avaliação da Sensibilidade e Especificidade do kit VISUAL-PAG, onde Kappa: 0,00–0,20 = concordância fraca; 0,21 - 0,40 = regular; 0,41 - 0,60 = moderada; 0,61 - 0,80 = boa; 0,81–1,00 = muito boa, valores negativos são interpretados como equivalentes a 0,00.

Discussão

Associado a fatores nutricionais e de ambiência, o manejo reprodutivo bem elaborado dentro de uma propriedade produtora de leite permite uma maior constância na produção leiteira durante todo o ano. Desafio este comum em fazendas que buscam produções eficientes. Barbosa et al (2011) comentam que, do contrário, um cenário reprodutivo ineficiente reduz a taxa de prenhez e aumenta o intervalo entre partos, o que diminui, conseqüentemente, a produção de bezerras e aumenta os custos de manutenção das vacas secas.

O diagnóstico gestacional, quando realizado o mais precoce possível, possibilita a tomada de decisão no manejo das fêmeas que não emprenharam. De modo a encurtar o período de serviço e otimizar a produção leiteira. Romano et al (2007) e Silva et al (2009) destacam as técnicas de palpação retal e ultrassonografia como as mais utilizadas para diagnóstico precoce de gestação. Todavia, Pohler et al (2016) inferem que as mesmas são limitadas no que diz respeito a quantidade de técnicos habilitados para esse diagnóstico.

Neves et al (2008) relatam que exames ecográficos realizados antes do 25º dia estão 50% mais susceptíveis a erros em relação aos feitos a partir dessa data. Descôteaux et al (2009) acrescentam que a ultrassonografia se torna rápida e segura quando realizada a partir do 27º dia pós IA.

A detecção de prenhez através de métodos químicos tem se tornado uma prática cada vez mais comum (POHLER et al., 2016). No que diz respeito a estes métodos, as PAG's, por sua vez, têm sido descritas na literatura como um bom marcador da gestação e da viabilidade fetal com ascendência no sangue materno a partir do 22º dia de gestação (ABDULKAREEM et al., 2012).

O Kit-VISUAL da Idexx é um método químico de diagnóstico de gestação precoce, rápido e de fácil aplicação em condições de campo. Sendo baseado em técnicas de laboratório para detecção de prenhez a partir do 28º dia pós-serviço. Nesse estudo, as análises realizadas através desse kit demonstraram 100% de sensibilidade e 94,7% de especificidade, iguais para os dias 25, 26, 27 e 28 pós-IATF das fêmeas leiteiras da raça girolando, frente aos resultados obtidos no exame ultrassonográfico no D32. Dados estes, semelhantes aos observados no experimento de Bragança et al (2012) com vacas zebuínas quando se avaliou a acurácia do kit-Visual no 25º e 28º dia pós-IATF, com sensibilidade de 100% e especificidade de 92,86%.

Já no experimento de Karen et al (2015), ao analisarem a sensibilidade e especificidade do teste ELISA (VISUAL-PAG), em 100 vacas da raça holandesa ao 28º dia

pós-IATF, os resultados foram divergentes em relação ao presente estudo, com sensibilidade de 90,2% e especificidade de 98,3%. Mercadante et al (2013) apontam que estas divergências podem estar relacionadas às variações de expressão das PAG's no soro materno em virtude das diferenças entre raças de bovinos. Roberts et al (2015) relataram que os animais *Bos indicus* apresentaram maior concentrações de PAG no soro no início da gestação quando comparados aos animais *Bos taurus* com a genética Angus.

Neste experimento, os animais utilizados foram oriundos do cruzamento entre *Bos taurus* (Holandês) e *Bos indicus* (Gir), observando-se elevada sensibilidade para detecção das PAG's no soro sanguíneo. A elevada especificidade também verificada no estudo se assemelham aos resultados obtidos por Bragança et al (2012) em fêmeas zebuínas; Green et al (2009) em bovinos leiteiros e Karen et al (2007) em búfalas.

Apenas dois animais diagnosticados como prenhe no período de 25 a 28 pós-IATF mediante pesquisa das PAG's, tiveram resultados diferentes ao observado no D32 através do exame de ultrassom. Culminando num resultado falso-positivo. Todavia, este resultado falso-positivo também foi verificado no estudo de Bragança et al (2012), sendo atribuído às perdas embrionárias. É possível que os dois animais tiveram perda embrionária, mas ainda apresentavam PAG's circulantes possíveis de serem detectadas pelo teste nas coletas do dia 25 a 28. E no momento da realização do teste padrão do experimento no D32, as fêmeas apresentaram-se vazias.

A mortalidade embrionária neste período de gestação coincide com os resultados apresentados por Barros e Visintin (2001), onde relataram maior perda embrionária no período de 25-45 dias de gestação. Semelhante a estes resultados, Vasconcelos et al (1997), descreveram que a mortalidade embrionária tardia ocorre com maior frequência entre 28-42 dias de gestação. Ambos os experimentos justificam os resultados falso-positivo obtidos nesse estudo.

Conclusão

Apesar do fabricante do kit-VISUAL recomendar seu uso em bovinos a partir do 28º dia pós-serviço, nesse estudo, houve concordância estatística, quando se antecipa o teste para o 25º dia pós-IATF em fêmeas leiteiras da raça Girolando. Podendo o mesmo ser utilizado com segurança como método de diagnóstico de gestação precoce em fêmeas bovinas desta raça.

REFERÊNCIAS

- 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.
- BARBOSA, C.F.; JACOMINI, J.O., DINIZ, E.G., SANTOS, R.M., TAVARES, M. Inseminação artificial em tempo fixo e diagnóstico precoce de gestação em vacas leiteiras mestiças. **R. Bras. Zootec.**, v.40, n.1, p.79-84, 2011.
- 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.
- BRAGANÇA, G.M.; VIANA, R.B.; CAMPELLO, C.C.; ZIMMERMAN, S.O.; OLIVEIRA, W.M.; CAMPOS, D.S.; MEDEIROS, R.L.F. Diagnóstico precoce de gestação em vacas zebuínas pela detecção de glicoproteínas associadas à prenhez. 2012. 37 66f. **Dissertação** (Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2012.
- CHAVES, C. M. S. Teste imunoenzimático visual para detecção de glicoproteínas associadas à prenhez em ovelhas. 2016. 66p. **Dissertação** (Mestrado em produção animal sustentável) – Instituto de Zootecnia, Nova Odessa, 2016.
- COMMUN, L.; VALEK, K.; BARBRY, JEAN-B; SAN PUN; RICE, A.; MESTEK, A.; EGLI, C.; LETERME, S. Detection of pregnancy-associated glycoproteins in milk and blood as a test for early pregnancy in dairy cows. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** 1-7.DOI: 10.1177/1040638716632815 jvdi.sagepub.com. 2016.
- DESCÔTEAUX, L.; GNEMMI, G.; COLLOTON, C. Ultrasonography of bovine female genital tract. **Veterinary Clinics Food Animal**, v.25, p.733-752, 2009.
- 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 Diagnóstico precoce de gestação em vacas zebuínas utilizando a detecção de glicoproteínas associadas à prenhez reprodutiva em fêmeas Nelore e cruzadas. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.104, p.31-35, 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.
- 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.

HOSMER D.W.; LEMESHOW S. **Applied Logistic Regression**. New York: John Wiley & Sons, 1989, 241p.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Pecuária Municipal 2015, v. 39, p.1-63, 2015. Acesso em: out/2016. **Disponível em:** <http://www.ibge.gov.br>

KAREN, Aly et al. Comparison of a commercial bovine pregnancy-associated glycoprotein ELISA test and a pregnancy-associated glycoprotein radiomimmunoassay test for early pregnancy diagnosis in dairy cattle. **Animal reproduction science**, v. 159, p. 3137, 2015.

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.

LEITE, T. E.; MORAES, J.C.F.; PIMENTEL, C. A. Eficiência produtiva e reprodutiva em vacas leiteiras. **Revista Ciência Rural**. Santa Maria, Pelotas, v.31, n.3, pg. 467-472, 2001. MERCADANTE, P. M. et al. Subspecies differences in early fetal development and plasma pregnancy-associated glycoprotein concentrations in cattle. *Journal of animal science*, v. 91, n. 8, p. 3693-3701, 2013. Nebel, R. L. 1988. On farm milk progesterone tests. **Journal of Dairy Science**. 71:1682–1690.

MORAES, F. Análise da rentabilidade de sistemas de produção de leite participantes no programa “Balde Cheio” no estado do Rio de Janeiro. 2013. 279p. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Federal de Lavras.

NEVES, J.P.; OLIVEIRA, J.F.C.; FREITAS, V.J.F.; SIMPLÍCIO, A.A.; TEIXEIRA, D.I.A; ALMEIDA, J.L. Diagnóstico de prenhez em ruminantes. **In:** GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, J.V. F. Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal. São Paulo: Varela, p.17--32, 2008. Cap 1.

NEVES, J.P.; OLIVEIRA, J.F.C.; MACIEL, M. N. Diagnóstico de gestação em bovinos. **In:** GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, J.V. F. Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal. São Paulo: Varela, p.01-13, 2002. Cap 1.

POHLER, K. G. et al. Circulating concentrations of bovine pregnancy-associated glycoproteins and late embryonic mortality in lactating dairy herds. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 2, p. 1584-1594, 2016.

ROBERTS, J. N.; BYREM, T. M.; GROOMS, D. L. Application of an ELISA Milk Pregnancy Test in Beef Cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n. 4, p. 651-658, 2015.

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.

SILVA, R. A. STERRY, D. KOLB, N. MATHIALAGAN, M. F. MCGRATH, J. M. BALLAM, AND P. M. FRICKE. 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. 2009. **J. Dairy Sci.** 92:3643–3650 doi:10.3168/jds.2008-1704.

TORRES JUNIOR, J.R.S., MELO, W.O., ELIAS, A.K.S., RODRIGUES, L.S., PENTEADO, L., BARUSELLI, P.S. Considerações técnicas e econômicas sobre reprodução assistida em gado de corte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.33, n.1, p.53-58, jan./mar, 2009.

VASCONCELOS, J.L.M., Silcox, R.W., Lacerda, J.A., Pursley, J.R., Wiltbank, M.C. Pregnancy rate, pregnancy loss, and response to heat stress after AI at 2 different times from ovulation in dairy cows. **Biol. Reprod.** 1997;56:140.