

DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÕES GEMELARES E DE PERDAS EMBRIO/FETAIS EM BOVINOS PELO DOSEAMENTO DA PSPB.

TWIN PREGNANCY AND EMBRYO/FETAL LOSS DIAGNOSIS IN COWS BY MEASURING PSPB.

M. Irene. Vasques, Carla C. Marques, A.E.M. Horta, P. Humblot* e G. Sasser**
Dpto. de Reprodução Animal, Estação Zootécnica Nacional-INIA, Vale de Santarém
* UNCEIA, Services Techniques 13 Rue Jouet 94703 Maisons Alfort, France
** University of Idaho, Dpt. Anim. Sciences, 83843 Moscow Id. U.S.A.

Resumo

Numa população de 176 vacas Alentejanas, procurou-se diagnosticar a gestação, a gemelaridade, e as perdas embrio/fetais pelo doseamento da *Pregnancy Specific Protein B* (PSPB) durante a gestação. A gemelaridade foi induzida por transferência de embriões FIV associada ou não à inseminação artificial, no âmbito do projecto ECLAIR n° AGRE 0018 realizado entre 1990 e 1993 na Estação Zootécnica Nacional. A PSPB foi doseada por RIA em amostras plasmáticas colhidas mensalmente a partir dos 40 dias após a ovulação. As concentrações de PSPB foram comparadas entre vacas não gestantes (n=24); com gestações singulares (n=72) e gemelares (n=29); e em animais nos quais tendo sido precocemente diagnosticada a gestação, vieram a sofrer perdas embrionárias ou fetais (associadas ou não a *stress* térmico; n=51).

Não se detectaram níveis de PSPB aos 40, 70 e 100 dias após a ovulação nos animais confirmados não gestantes. As vacas com gestações singulares apresentaram níveis da proteína significativamente inferiores aos das vacas que vieram a parir gémeos, aos 40 dias pós-ovulação ($1,87 \pm 0,14$ vs. $3,63 \pm 0,43$ ng/ml, respectivamente; $P < 0,0001$). Animais com perdas embrionárias consequentes ou não a *stress* térmico ambiental apresentaram, aos 40 dias, valores significativamente inferiores aos de vacas gestantes de singulares ($0,15 \pm 0,09$ e $0,56 \pm 0,18$ vs. $1,87 \pm 0,14$ ng/ml, respectivamente; $P < 0,0001$). As vacas que vieram a abortar após diagnóstico de gestação por palpação rectal (³ 40 dias) não apresentaram, nesta fase da gestação, diferenças significativas nos níveis da PSPB relativamente às gestantes de singulares. A elevação dos níveis de PSPB durante gestações singulares e gemelares realizam-se segundo um modelo multiplicativo correspondente à equação $Y = a \cdot X^b$ ($Y = 0,0000601 \cdot X^{2,88}$, $r = 0,99$; $P < 0,0001$). Os valores de PSPB medidos aos 240 dias de gestação e na altura do parto foram significativamente superiores nas vacas com gémeos ($684,96 \pm 91,33$ vs. $334,89 \pm 25,06$ e $940,4 \pm 126,14$ vs. $592,57 \pm 54,27$ ng/ml, respectivamente; $P < 0,007$).

O doseamento da PSPB aos 40 dias após a ovulação permite diagnosticar a gestação, a gemelaridade e perdas embrio/fetais. A elevação da PSPB durante a gestação apresenta uma cinética multiplicativa do tipo $Y = a \cdot X^b$ sendo preditiva relativamente à idade da gestação. As gestações gemelares apresentam valores significativamente superiores aos 40 e 240 dias e na altura do parto.

Summary

The aim of this work was to diagnose single and twin pregnancies as well as embryo/fetal losses occurring during gestation in 176 Alentejano beef cows by measuring plasma levels of *Pregnancy Specific Protein B* (PSPB). Gemelarity was induced by the transfer of IVM/IVF bovine embryos associated or not to artificial insemination under the research project nr. AGRE 0018 of the EC ECLAIR program. Females were bled monthly starting at 40 days post-ovulation and plasma samples were used to measure PSPB by radioimmunoassay. Data were compared between non-pregnant (n=24), single (n=72) and twin (n=29) carrying cows and early pregnant animals failing to maintain gestation due to embryo/fetal mortality associated or not to heat stress conditions (n=51).

Non-pregnant cows showed undetectable levels of PSPB on days 40, 70 and 100 post-ovulation. On day 40, single calving cows presented significantly lower levels of PSPB than twin calving cows (1.87 ± 0.14 vs. 3.63 ± 0.43 ng/ml, respectively; $P < 0.0001$). Cows with high progesterone levels on days 21 and 40, with detectable levels of PSPB at least on day 40 post-ovulation and not detected pregnant by rectal palpation were considered to have an embryo mortality. These animals presented significantly lower levels of PSPB than single carrying cows on day 40 post-ovulation, whether or not embryo loss was associated with environmental heat stress (0.15 ± 0.09 and 0.56 ± 0.18 ng/ml vs. 1.87 ± 0.14 ng/ml, respectively; $P < 0.0001$). Cows diagnosed pregnant by rectal palpation and aborting later than 40 days of gestation did not present, at this stage of pregnancy, significant differences in PSPB levels relatively to single calving cows. Levels of PSPB in single and twin calving cows raised during pregnancy according with the following multiplicative model: $Y = a \cdot X^b$ ($Y = 0.0000601 \cdot X^{2.88}$, $r = 0.99$; $P < 0.0001$). Cows carrying twins also presented significantly higher levels of PSPB on day 240 and at parturition than single carrying animals (684.96 ± 91.33 vs. 334.89 ± 25.06 and 940.4 ± 126.14 vs. 592.57 ± 54.27 ng/ml, respectively; $P < 0.007$).

Pregnancy, twinning and embryo/fetal mortality in cows may be diagnosed by plasma determination of PSPB at 40 days after ovulation. Levels of PSPB raise during pregnancy according with a multiplicative kinetics, allowing to predict the age of gestation; twin carrying animals presenting significantly higher levels at 40 days, 240 days and at parturition.

INTRODUÇÃO

A PSPB (Pregnancy Specific Protein B) é uma proteína sintetizada pela placenta dos bovinos durante a gestação, inicialmente isolada por Butler et al. (1). O seu doseamento por RIA foi implementado por Sasser et al. (2) e por Humblot et al. (3).

É possível determinar a sua presença no plasma de vacas gestantes a partir dos 20 dias até ao parto, havendo um aumento das suas concentrações durante toda a gestação, o que permite avaliar a idade aproximada da mesma (2).

O diagnóstico de perdas embrionárias através do seu doseamento foi realizado em grande número de vacas de diferentes raças (3, 4, 5).

A indução de gestações gemelares em grande escala nas raças de carne por transferência de embriões totalmente produzidos *in vitro* (6, 7), muito beneficiaria de um método eficiente para o diagnóstico de gémeos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Numa população de 176 vacas Alentejanas adultas em que se utilizou a inseminação artificial (IA) e/ou a transferência de embriões FIV para a indução de gestações gemelares, colheram-se amostras de sangue periférico para doseamento da progesterona (P4; aos 21 e 42 dias pós-cio) e da PSPB (aos 40, 70, 100, 120, 150, 180, 210, 240 dias de gestação e na altura do parto).

Os animais encontravam-se em regime de pastoreio extensivo e os cios foram induzidos em sessões diferentes de acordo com um método descrito noutra trabalho (8).

As gestações foram confirmadas por ultrasonografia e palpações transrectais aos 40, 60 e 100 dias pós-cio.

A P4 foi doseada por RIA de acordo com um método descrito anteriormente (9). Concentrações de P4 inferiores a 1 ng/ml aos 21 e 42 dias pós cio serviram para diagnosticar as vacas não gestantes. A PSPB foi doseada por RIA em fase sólida segundo um método descrito anteriormente (4). Todas as amostras foram doseadas em duplicado em diluições de 0-1/500 nos gémeos e de 0-1/200 nos singulares, de acordo com as concentrações esperadas para cada fase da gestação.

Os animais com concentrações altas de P4, pelo menos aos 21 dias, e que à palpação rectal/ultrasonografia foram confirmados não gestantes, classificaram-se como: 1) também não gestantes (NG; n° total=24) quando as concentrações de PSPB aos 40 dias não foram detectadas (<0,01 ng/ml) ou; 2) como tendo evoluído para a mortalidade embrionária (ME; n=16), quando os teores de PSPB aos 40 dias foram superiores ao limiar de detecção vindo a decaír ao longo da amostragem subsequente. Houve um grupo de vacas com as características das ME que, por terem sido submetidas a um intenso stress térmico ambiental durante os 100 dias subsequentes à sincronização e IA/TE, foram classificadas separadamente (ST; n=10)

Os animais com pelo menos um diagnóstico de gestação positivo à palpação/ultrasonografia, com níveis detectáveis de PSPB pelo menos aos 40 dias, e que mais tarde vieram a ser diagnosticados como não gestantes ou não chegaram a parir, foram classificados como tendo abortado (ABO; n=25).

As gestações gemelares (GEM; n=29) e singulares (SING; n=72) foram classificadas de acordo com o número de vitelos nascidos.

As concentrações de PSPB para cada um dos períodos estudados, foram comparadas entre todas estas classes de animais por análise de variância (ANOVA) e por testes de menores diferenças significativas (LSD), para uma probabilidade de erro inferior a 5%. Foi igualmente realizada uma aproximação para o melhor ajustamento entre as concentrações da PSPB (ng/ml) e a idade da gestação (dias), tendo-se adoptado o modelo multiplicativo $Y = a \cdot X^b$ como o mais preditivo onde Y =níveis de PSPB e X =dias de gestação e em que a e b identificam a origem e o coeficiente da regressão, respectivamente.

RESULTADOS

Os resultados relativamente às diferenças nas concentrações de PSPB aos 40 dias após o cio induzido entre todas as classes de vacas, apresentam-se na Tabela 1. Assim, as vacas não gestantes (NG) diferenciam-se significativamente de todas as outras classes pois não apresentaram teores detectáveis da PSPB. As vacas SING ($1,87 \pm 0,138$ ng/ml) apresentam teores significativamente mais elevados que as ME e as ST ($0,555 \pm 0,183$ e $0,154 \pm 0,094$ ng/ml, respectivamente; $P < 0,0001$). As vacas classificadas como ABO ($2,77 \pm 0,339$ ng/ml) apresentam teores semelhantes às SING ($P > 0,05$), e valores significativamente mais elevados que as ST e ME ($P < 0,0001$). Nesta altura, as vacas GEM apresentaram níveis de PSPB significativamente superiores a todas as outras classes ($3,63 \pm 0,426$ ng/ml; $P < 0,0001$).

Tabela 1 - Níveis de PSPB ao 40º dia após o cio em vacas Alentejanas inseminadas e/ou transferidas com embriões FIV. Diferenças entre gestações singulares (SING), Gemelares (GEM), morte embrionária (ME), perdas associadas a stress térmico (ST) e abortos (ABO).

Classe	(n)	Média (ng/ml)	Interv. Conf. da média (95%)		LSD P<0,0001
			Min	Max	
ME	16	0,555	0,075	1,035	a
ST	10	0,154	-0,454	0,762	a
ABO	25	2,276	1,892	2,661	b
SING	72	1,871	1,645	2,098	b
GEM	29	3,629	3,272	3,986	c

Na classe das perdas embrionárias devidas ao stress térmico, 6 de 10 animais apresentaram valores não detectáveis de PSPB aos 40 dias, vindo a exibí-los nas colheitas dos 70-100 dias. Na classe da ME não associada a ST, somente uma vaca apresentou esta característica.

O número de amostras da classe GEM que apresenta valores mais baixos do que o limite de confiança máximo da classe SING corresponde a 20,7% (6/29). Relativamente à classe SING, o número de amostras com valor superior ao limite de confiança mínimo da classe GEM correspondeu a 8,3% (6/72).

Aos 240 dias e na altura do parto, as gestações gemelares voltaram a exhibir concentrações de PSPB significativamente mais elevadas do que as gestações singulares ($685,0 \pm 91,3$ vs $334,9 \pm 25,1$ ng/ml, $P < 0,0001$ e $940,4 \pm 126,1$ vs $592,6 \pm 54,3$ ng/ml, $P < 0,007$; respectivamente).

As concentrações de PSPB quer em gemelares, quer em singulares, aumentaram significativamente ao longo da gestação segundo um modelo multiplicativo ($Y = 0,0001007 \cdot X^{2,81}$ e $Y = 0,0000359 \cdot X^{2,95}$, respectivamente; Figura 1). A regressão conjunta obtida foi: $Y = 0,0000601 \cdot X^{2,88}$, $r = 0,99$; $P < 0,0001$.

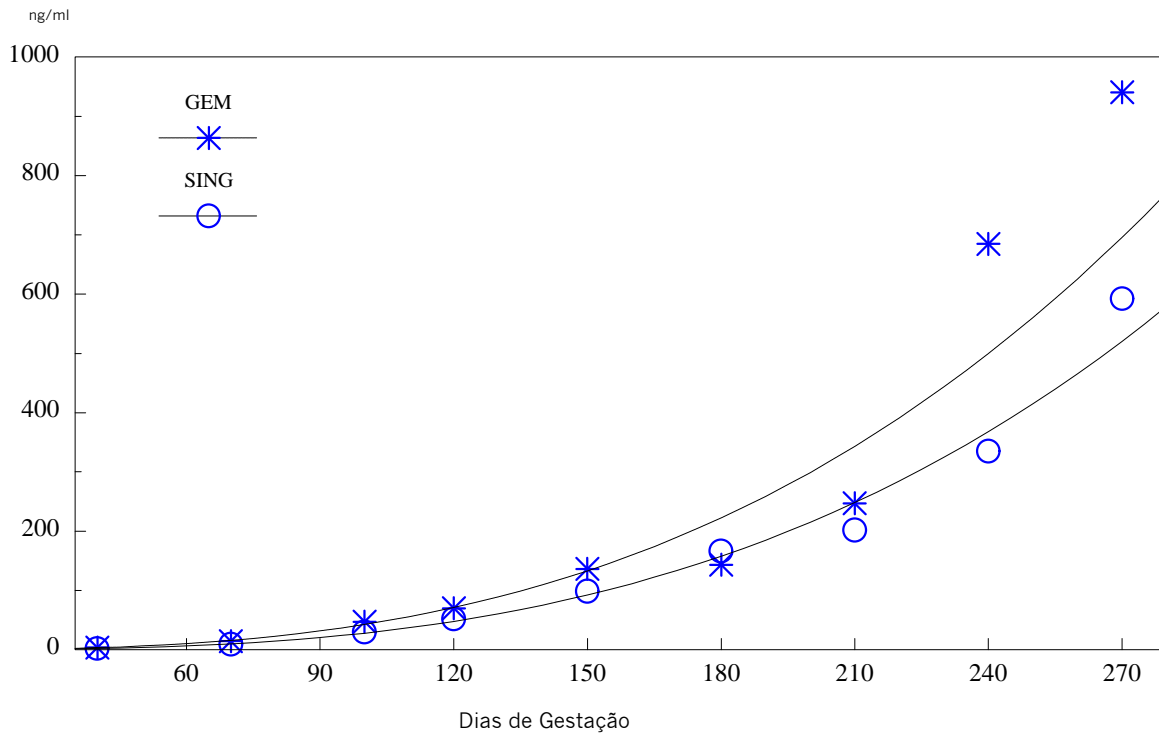


Figura 1 - Regressões multiplicativas das concentrações de PSPB ao longo de gestações gemelares e singulares .

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os resultados evidenciam a possibilidade da utilização do doseamento da PSPB no diagnóstico de gestações gemelares em bovinos, em doseamentos efectuados aos 40 dias (precisão para gémeos de 79,3% e para singulares de 91,7%). Os métodos utilizados até agora baseiam-se na observação de gémeos por ultrasonografia, cerca dos 50-60 dias de gestação, com uma taxa de predição de gemelares de 75,7% e de singulares de 82,4% (10). Outros métodos hormonais com base no doseamento do sulfato de estrona poderão eventualmente ser utilizados no diagnóstico de gémeos. Com efeito, a partir dos 100 dias de gestação, existe uma correlação dos teores desta hormona com a presença de gémeos (10). No entanto, nesta fase de gestação o crescimento acelerado de alguns fetos singulares até ao parto pode dar origem a teores da hormona semelhantes aos de gestações gemelares (10). O efeito de fetos singulares com um potencial de crescimento superior sobre a produção de PSPB, é natural que não ocorra aos 40 dias de gestação, desaparecendo aqui este factor de erro. Mais tarde na gestação (>210 dias), a presença de gémeos volta a manifestar concentrações mais elevadas de PSPB.

À semelhança de resultados obtidos noutras raças (3, 5), através de doseamentos de PSPB por volta dos 30 dias de gestação, os doseamentos realizados aos 40 dias na raça Alentejana confirmam a possibilidade de diagnóstico de mortalidade embrionária. De acordo com outros trabalhos (3, 11), embora exista a possibilidade de vacas gestantes não apresentarem níveis detectáveis de PSPB cerca dos 24 dias, essa possibilidade é remota quando o diagnóstico se realiza aos 30 dias. Neste trabalho, verificou-se que quando os animais são submetidos a um intenso stress térmico ambiental durante o período inicial de gestação, a ocorrência de mortalidade embrionária caracteriza-se pela existência de 60% de animais com níveis não

detectáveis da proteína aos 40 dias. Estes níveis vêm a ser detectados em colheitas subsequentes e a decair posteriormente. Na classe de vacas em que se detectou mortalidade embrionária não associada a stress térmico, somente um animal em 16 mostrou esta característica. Aos 30 dias de gestação, as vacas com mortalidade embrionária não apresentam diferenças significativas relativamente às vacas que permanecem gestantes (3), contrariamente ao sucedido em vacas Alentejanas quando o doseamento é realizado aos 40 dias.

A influência do stress térmico em novilhas, quando expostas a uma temperatura ambiental constante de 32,2°C, manifesta-se por ausência de concepção (12). Trabalhos em bovinos (13) e ovinos (14) revelam que o shock térmico conduz a um desequilíbrio na síntese de prostaglandinas traduzido pelo aumento da síntese de PGF2 α e uma diminuição da síntese de PGE2. Isto pode conduzir à luteólise e mortalidade embrionária consequente. As células gigantes binucleadas do trofoblasto são tidas como as principais responsáveis por uma maior síntese relativa de PGE2 à custa da conversão da PGF2 α (15) e também estimulada pela PSPB (16). A diminuição dos níveis de PSPB observada em vacas submetidas a stress térmico neste trabalho parece ser mais uma das consequências da perturbação do metabolismo destas células pelo calor, visto que são também estas as células identificadas como responsáveis pela síntese de PSPB (17).

A possibilidade de falsos diagnósticos negativos pelo doseamento da PSPB aos 40 dias foi nula quer em gestações singulares quer em gemelares, o que pode não ocorrer quando o diagnóstico é realizado antes dos 30 dias (11). De acordo com resultados obtidos anteriormente em caprinos, a exatidão do teste entre os 30 e 40 dias de gestação é de 89% enquanto que pela progesterona a precisão é de 71,4% aos 21 dias (18).

Os abortos ocorridos para além dos 40 dias de gestação não denunciaram aos 40 dias de gestação níveis inferiores de PSPB. Contudo, os doseamentos posteriores não apresentavam aumentos idênticos aos de animais gestantes. Neste grupo de animais, existe a probabilidade de alguns serem portadores de gémeos aos 40 dias, visto que a concentração média de PSPB nessa altura mostrou uma tendência para ser superior aos valores das gestações singulares.

BIBLIOGRAFIA

- 1 - Butler, J.E., Hamilton, W.S., Sasser, R.G., Ruder, C.A., Hass, G.M., Williams, J.J. (1982). Detection and parcial characterization of two bovine pregnancy specific protein. *Biol. Reprod.*, **26**: 925-933.
- 2 - Sasser, R.G., Ruder, C.A., Ivani, K.A., Butler, J.E., Hamilton, W.C. (1986). Detection of pregnancy by radioimmunoassay of a novel pregnancy specific protein in serum of cows and a profile of serum concentrations during gestation. *Biol. Reprod.*, **35**: 936-942.
- 3 - Humblot, P., Camous, S., Martal J., Charleroy, J., Jeanguyot, N., Thibier, M., Sasser, R.G. (1988). Pregnancy specific protein B, progesterone concentrations and embryonic mortality during early pregnancy in dairy cows. *J. Reprod. Fert.*, **83**: 215-223.
- 4 - Humblot, P., Jeanguyot, N., Ruder, C.A., Leriche, I., Thibier, M., Sasser, R.G. (1988). Accuracy of pregnancy diagnosis by bPSPB RIA in the plasma of dairy cows 28 days after I.A. Proceedings of 11th Int. Cong. on Animal Reproduction and Artificial Insemination. Dublin. **Vol. 2**: 94-96.
- 5 - Humblot, P., Payen, B., Jeanguyot, N., Thibier, M., Sasser, R.G. (1991). Progesterone and pregnancy specific protein B concentrations in serum and plasma 28-30 days after AI and their relationship with embryonic mortality in French beef breeds. *J. Reprod. Fert.*, **Suppl. 43**:302-303. (Abst.).
- 6 - Reichenbach, H.D., Liebrich, J., Berg, U., Brem, G. (1992). Pregnancy rates and births after unilateral or bilateral transfer of bovine embryos produced in vitro. *J. Reprod. Fert.*, **95**:363-370.

- 7 - Horta, A.E.M., Marques, C.C., Vasques, M.I., Leitão, R.M., Vaz Portugal, A.V. (1993). Indução de gestações gemelares em vacas de carne por transferência de embriões produzidos *in vitro*. 5º. Simpósio Internacional de Reprodução Animal. Luso. Aceite para publicação.
- 8 - Horta, A.E.M., Vasques, M.I., Marques, C.C. (1993). Interpretação de perfis de progesterona durante a sincronização dos ciclos para transferência de embriões FIV em vacas Alentejanas. 5º. Simpósio Internacional de Reprodução Animal. Luso. Aceite para publicação.
- 9 - Vasques, M.I. (1990). Relatório de Actividades. Adenda. EZN/INIA. Vale de Santarém.
- 10 - Mayne, S. (1991). Resultados não publicados. Comunicação pessoal.
- 11 - Humblot, P. (1993). Utilisation des dosages hormonaux dans le control de la reproduction chez la vache laitiere. 5º. Simpósio Internacional de Reprodução Animal. Luso.
- 12 - Thatcher, W.W., Collier, R.J. (1986). Effects of climate on bovine reproduction. In: Current Therapy in Theriogenology: Diagnosis, Treatment and Prevention of Reproductive Diseases in Animals. D.D. Morrow (Ed.). 2nd Ed., pp. 301-309.
- 13 - Malayer, J.R., Hansen, P.J., Gross, T.S., Thatcher, W.W. (1990). Regulation of heat shock-induced alterations in the release of prostaglandins by the uterine endometrium of cows. *Theriogenology*, **34**: 219-230.
- 14 - Malayer, J.R., Hansen, P.J. (1990). Effect of *in vitro* heat shock upon the synthesis and secretion of prostaglandins and protein by uterine and placental tissues of the sheep. *Theriogenology*, **34**: 231-249.
- 15 - Gross, T.S., Williams, W.F. (1988). Bovine placental prostaglandin synthesis: principal cell synthesis as modulated by binucleate cell. *Biol. Reprod.*, **38**: 1027-1034.
- 16 - Del Vecchio, R.P., Sasser, R.G., Randel, R.D. (1990). Effect of pregnancy-specific protein B on prostaglandin F2a and prostaglandin E2 release by day 16-perifused bovine endometrium tissue. *Prostaglandins*, **40**: 271-282.
- 17 - Eckblad, W.P., Sasser, R.G., Ruder, C.A., Panlasigui, P.M., Kuckzanski, T.S. (1985). Localization of pregnancy-specific protein B (PSPB) in bovine placental cells using a glucose oxidase-anti-glucose oxidase immunohistochemical stain. *J. Anim. Sci.*, **61 (Suppl. 1)**: 149 (abstr.).
- 18 - Humblot, P., Courtin, H., Jeanguyot, N., Thibier, M., Sasser, G. (1992). Pregnancy specific protein B and oestrone sulfate concentrations during pregnancy and embryonic mortality in dairy goats. Proceedings of the 12th Int. Cong. on Animal Reproduction. The Hague. **Vol 3**: 1246-1248.