

DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
DIRETOR: Prof. Dr. J. F. Tabarelli Neto

BUFO-REAÇÃO NO DIAGNÓSTICO PRECOCE DA PREENHEZ NA ÉGUA PURO
SANGUE INGLÊS - Resultados do Seu Emprêgo Durante Quinze Estações de Monta

(Diagnosis of Early Pregnancy in the Thoroughbred Mare by the Toad
Test - Results of its utilization during fifteen breeding seasons)

J. F. Tabarelli Neto
Professor Cotedrótico

U. R. Reiner
Professor Assistente

F. S. Pereira Lima
Veterinário

O. Bizutti
Instrutor

I. INTRODUÇÃO

Procuramos apresentar neste trabalho as observações colhidas pelo emprêgo da bufo-reação, no diagnóstico precoce da prenhez na égua P.S.I., durante quinze estações de monta. A finalidade precípua dêste relato fundamenta-se na existência de resultados discordantes, quanto à eficácia do teste, assinalados por pesquisadores outros. Alguns salientando-lhe o valor, sobretudo quando estudado comparativamente com outros métodos já conhecidos, cutros julgando-o de valor não tão elevado.

Dentre a já numerosa literatura existente acêrca do assunto, faremos referência, tão somente, aos trabalhos que pelas suas caractérísticas julgamos de interêsse citar. Assim sendo, salientamos os seguintes: SCHWEITZER e BAS (1); TABARELLI (2-3); PERO (4); HINGLAIS e HINGLAIS (5); MAYER e col. (6); CASTELLI (7); PUJOL (8); BRAZEL (9); PEDRAZA (10); CALISTI (11); WOHLZOGEN (12); SATO e MURAMATSU (13); BENTZ (14); SABROSO (15); JUHÁSZ e DÓZSA (16); OSSWALD (17); RAULLET (18); EIELANSKY e col. (19); SAKUMA (20); GALLO e col. (21); BERRY e col. (22); PLAZA SUÑER (23); CUBONI (24); MORALES e DAMONTE (25); McMANAMY e

col. (26); SANSONOVA (27) e CHIEFFI e col. (28).

Ressalta-se, todavia, que em muitos dos trabalhos, cujos resultados foram menos animadores, empregaram-se para o teste animais da família *Ranidae*, os quais, muito embora pertencentes à ordem *Salientia*, não têm comportamento similar ao apresentado pelos espécimes da família *Bufo*. Saliente-se que nas pesquisas fundamentais de GALLI MAZZINI (29), para o diagnóstico da gestação na mulher foi utilizado o *Bufo arenarum* Hensel, e as de TABARELLI (2-3), no diagnóstico precoce da prenhez na égua P.S.I. foram usados o *Bufo marinus* e o *Bufo paracnemis* Lutz.

Entendemos que, além da assinalada, outras causas de erro existem concorrendo para reduzir a eficácia do método. Tais falhas, mesmo nas pesquisas em que se utilizaram espécimes do gênero *Bufo*, residem, sobretudo, na dose de soro injetada (26), na época da suposta prenhez em que foi coletada a amostra de sangue (6), no modo de manutenção dos sapos, na temperatura do laboratório e na época do ano. Acresce que muitos dos resultados apontando a negatividade do teste, foram obtidos por ocasião da introdução do mesmo, isto é, momento no qual não estavam ainda delineados, como é óbvio, os pontos fundamentais da técnica a empregar.

2 MATERIAL E MÉTODO

Em seus fundamentos o material e método empregados seguiram

as normas preconizadas por TABARELLI (2-3), todavia, faz-se necessário ressaltar alguns pontos da mesma.

2.1 - ANIMAIS USADOS. Como animais testes utilizamos machos das espécies *Bufo marinus* em aproximamdamente 90 por cento das provas e o *Bufo paracnemis* nos dez por cento restantes. Os exemplares da primeira espécie citada pesavam entre 90 e 120 g e os da segunda entre 150 e 320 g. Os sapos eram mantidos à temperatura do laboratório em recipientes especiais, garantindo-lhes o grau de umidade indispensável. A maior parte das provas foi efetuada entre os meses de setembro e janeiro, intervalo de tempo êste enquadrado, em nossa latitude, dentro do período mais favorável à resposta do sapo à gonadotrofina, VALLE e PARA-VENTI (30), BURGOS e MANCINI (31)

2.2 - AMOSTRAS DE SÔRO. O sangue foi recolhido de 313 éguas P.S.I. criadas em Haras localizados no Estado de São Paulo e que possuíam supervisão veterinária permanente.

O número de dias decorridos entre a última cobertura e a coleta de sangue oscilou entre 36 (mínimo) e 120 (máximo), efetuando-se, no total, 782 provas, sendo que uma mesma égua foi submetida ao teste em diferentes estações de monta. Da amostra recolhida em frascos de vidro limpos e secos retirava-se, após a retração do coágulo, o sôro que era injetado ou conservado no refrigerador. Apesar dos trabalhos de SANTAMARINA e JOVEN (32-33-34), referentes à queda no teor hormonal de soros conservados à temperatura ambiente (20°C), tínhamos conhecimento de pesquisas outras que

assinalavam a alta resistência da gonadotrofina sérica aos processos putrefativos e a diversos agentes químicos, GROSS e COLE (35), COLE (36); ARNOLD (37); SACHWEH (38) e CUBONI (39). Fato este de importância se consideramos:

- a - ter sido o sangue coletado em recipientes não esterilizados,
- b - pela dificuldade freqüente de se manter a amostra à baixa temperatura, notadamente no transporte de pontos a fastados do laboratório e
- c - principalmente por ter-se efetuado grande número de provas durante o verão.

Algumas amostras de sangue já alteradas quando recebidas, ou soros positivos deixados à temperatura do laboratório por uma semana, continuavam a desencadear respostas positivas, apesar do odor acentadamente pútrido. Grande número de sapos sucumbia após a injeção dos soros putrefatos, porém dentro do prazo de um a três dias, isto é, muito tempo depois da leitura da prova. Por outro lado, soros positivos, aos quais se adicionou mertiolato de sódio na proporção de 1: 10.000 ou sulfatiazol sódico na concentração de 0,2 por cento e conservados à temperatura do laboratório, mantiveram a positividade por 13 meses (limite da observação), e, os sapos em prova, aparentemente, nada demonstraram sofrer.

2.3 - EMPREGO DO PLASMA. O plasma também pode ser empregado uma vez que não se utilize oxalatos como anti-coagulantes. Observações de TABARELLI e col. (40) demonstraram a capacidade dos oxalatos promoverem a libertação dos espermatozoides do sapo.

2.4 - TÉCNICA

2.4.1 - NÚMERO DE SAPOS POR PROVA. Para o teste reco
mandamos, no mínimo,
o emprego de dois sapos. Fundamenta-se tal critério na possibilidade
de se poder encontrar sapos menos sensíveis à gonadotrofina sérica,
como ainda na variabilidade do teor hormonal do sôro, seja pela
época da prenhez em que é feita a coleta, seja pelas característi
cas individuais da própria égua. As observações de MORALES e
DAMONTE ⁽²⁵⁾, a respeito, são bastante ilustrativas.

2.4.2 - OBTENÇÃO DA AMOSTRA DE URINA DOS SAPOS. A técnica se
guida para a
obtenção da amostra de urina do sapo foi, com pequenas modificações,
a preconizada por GALLI MAININI ⁽²⁹⁾ e TABARELLI ⁽²⁾.

Esse exame, precedendo a injeção do sôro, tinha por escopo
verificar a ausência de espermatozóides, acaso presentes por possível
libertação espontânea. Saliente-se, nesse sentido, não termos
anotado, até a presente data, um caso sequer de urina positiva, an
tes de submeter o animal à prova.

2.4.3 - EXAME MICROSCÓPICO. A gota de urina foi colocada
entre lâmina e lamínula e exa
minada ao microscópio com 200 aumentos e iluminação reduzida.

2.4.4 - INJEÇÃO DO SÔRO.

a - DOSE. Empregamos de 12 a 15 ml de sôro, dose
esta fundamentada no que já se descreveu com

relação à variabilidade do teor em hormônio do sôro e à existência de sapos menos sensíveis à gonadotrofina sérica. A nosso ver, os maus resultados obtidos por McMANAMNY e col., (26), prendem-se à pequena dose utilizada. SCHWEITZER e BAS (1), obtiveram percentagem de eficácia mais elevada empregando 12 ml de sôro em lugar de dez.

Com a dose de 15 ml a percentagem de mortalidade dos sapos oscilou ao redor de três por cento. Contudo, os casos de morte raríssimamente ocorreram antes das primeiras 24 horas após a injeção, mas sim, muito tempo depois da leitura da prova.

b - VIA DE ADMINISTRAÇÃO. O sôro foi injetado subcutaneamente, em um dos sacos linfáticos látero-caudais do animal.

Utilizamos agulha de 40 x 8/10 com bisel bem afiado, a qual, separada da seringa, era introduzida sob a pele na parte caudal do dorso, a meio centímetro de distância da linha média, em ângulo reto com a coluna vertebral, sempre do lado oposto ao saco linfático escolhido. Esta técnica impedia, na maioria das vezes, o refluxo do sôro injetado, dado o percurso longo da agulha antes de atingir o saco linfático e pela aderência maior dos tecidos à coluna vertebral.

c - LEITURA DA PROVA. Foi feita à 3a., 6a., 12a. e 24a. hora após a injeção.

A maioria das bufo-reações positivas ocorreram à 3a. hora, o restante à 6a. Foram raras as que se apresentaram à 12a. hora e, só excepcionalmente, à 24a. hora.

2.5 - CONTRAPROVAS DA BUFO-REAÇÃO. As contraprovas das

bufo-reações foram efetuadas:

- a - pelo parto ou sua ausência.
- b - pela volta do cio.
- c - pelo abôrto.
- d - pela necrópsia, nos casos de morte da égua.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No quadro I, apresentamos o total efetuado de bufo-reações, o número de éguas submetidas à prova, assim como os resultados, tanto concordantes como discordantes, obtidos.

QUADRO I

QUADRO GERAL DAS BUFO-REAÇÕES EFETUADAS,
CONSIDERANDO - SE O NÚMERO DE ÉGUAS
SUBMETIDAS À PROVA E OS RESULTADOS OBTIDOS.

Nº DE ÉGUAS	RESULTADOS CONCORDANTES		RESULTADOS DISCORDANTES		TOTAL
	PROVAS POSITIVAS	PROVAS NEGATIVAS	FALSO POSITIVOS	FALSO NEGATIVOS	
313	593	150	15	24	782

Os resultados falso-positivos, em número de quinze, também assinalados por outros autores que trabalharam com vários métodos biológicos no diagnóstico precoce da gestação na égua, têm como

causas, pelo o que se crê, quer o abortamento precoce não observado, quer a morte e reabsorção subsequente do feto. Dêsse modo, todos os autores são unânimes na afirmativa de não se interpretar, tais resultados, como falha do método empregado.

Os resultados falso-negativos foram em número de 24. Resultados semelhantes também foram evidenciados por outros autores. De modo geral, responsabilizam-se como causas principais de tal discordância, ao se trabalhar com sôro de égua, os seguintes fatores:

- a - período da prenhez em que é feita a coleta do sangue e,
- b - menor sensibilidade do animal de prova ao hormônio injetado.

De acôrdo com COLE e HART ⁽⁴¹⁾, a gonadotrofina sérica aparece no sangue da égua prenhe por volta do 37º ao 45º dia, atinge concentração máxima entre o 43º e o 80º dia, desaparecendo por volta do 180º. Estes mesmos autores estabeleceram como período mais próprio para o diagnóstico da prenhez da égua pela prova de ovulação da coelha, o compreendido entre o 49º e o 84º dia da gestação.

Como é óbvio, resultado negativo obtido em períodos aquém do limite mínimo, acima assinalado, requer a repetição da prova em fase mais avançada da suposta prenhez.

Dos 24 resultados falso-negativos, em 11 dêles o período da coleta teria concorrido para sua obtenção, pois referem - se quer a provas efetuadas muito precocemente sem a possibilidade de repetição posterior, quer a testes executados em períodos já muito avançados. Esses 11 resultados estão assim distribuídos:

- dois efetuados no 39º dia;
- três no 40º dia;

- um no 41º dia;
- dois no 43º dia;
- um no 98º dia e
- dois no 111º dia da

suposta prenhez. Esta suposição é reforçada pelo fato de obtermos em 18 oportunidades, reações negativas em provas efetuadas entre o 36º e 49º dia da cobertura, as quais se positivaram quando repetidas em fase mais avançada.

Em vista do exposto, julgamos oportuno classificar os resultados assinalados em três períodos:

- o primeiro abrangendo as provas efetuadas em fase mais precoce da suposta prenhez, isto é, entre o 36º e 44º dia da cobertura;
- o segundo referente às situadas entre o 45º e 90º dia, período êste considerado o mais indicado para a aplicação do teste e,
- finalmente, o terceiro, englobando as desenvolvidas em fases mais avançadas, isto é, entre o 91º e 120º dia (limite máximo das observações).

Os quadros II, III e IV, representam as bufo-reações realizadas, respectivamente, em cada um dos períodos acima apontados e associadas de acordo com o resultado da prova e a comprovação ou não da prenhez. Dão-nos, assim, idéia das gestações evidenciadas ou não pelo método, quando aplicado em períodos diferentes da suposta prenhez, abrangendo a maior parte da fase, durante a qual a gonadotrofina aparece e desaparece do sangue.

QUADRO II

BUFO - REAÇÕES REALIZADAS ENTRE O 36° E 44°
DIA DA COBERTURA, SEGUNDO O RESULTADO DA
PROVA E A COMPROVAÇÃO OU NÃO DA GESTAÇÃO.

Gestação Resultado	COMPROVADA	NÃO COMPROVADA	TOTAL
Positivo	116	3 *	119
Negativo	10 **	25	35
TOTAL	126	28	154

* Resultados Falso-positivos

** Resultados Falso-negativos

QUADRO III

BUFO - REAÇÕES REALIZADAS ENTRE O 45° E 90°
DIA DA COBERTURA, SEGUNDO O RESULTADO DA
PROVA E A COMPROVAÇÃO OU NÃO DA GESTAÇÃO.

Gestação Resultado	COMPROVADA	NÃO COMPROVADA	TOTAL
Positivo	461	11 (*)	472
Negativo	11 (**)	121	132
TOTAL	472	132	604

* Resultados Falso-positivos

** Resultados Falso-negativos

QUADRO IV

BUFO - REAÇÕES REALIZADAS ENTRE O 91º E 120º
DIA DA COBERTURA, SEGUNDO O RESULTADO DA
PROVA E A COMPROVAÇÃO OU NÃO DA GESTAÇÃO.

Gestação \ Resultado	COMPROVADA	NÃO COMPROVADA	TOTAL
Positivo	16	1 *	17
Negativo	3 **	4	7
TOTAL	19	5	24

* Resultados Falso-positivos

** Resultados Falso-negativos

Pelo exposto no quadro III, que representa as bufo - reações efetuadas entre o 45º e 90º dia da cobertura, período este, a nosso ver, o mais indicado para a aplicação do método, verifica-se que a exatidão da prova, isto é, o número de diagnósticos comprovados é igual a 96,35%, cifra esta que se eleva a 98,17%, caso se queira considerar os 11 resultados falso-positivos não como falhas do método.

Felo exame do Quadro II, que demonstra as provas realizadas entre o 36º e 45º dia da suposta prenhez, período durante o qual a obtenção de resultado negativo não significa ausência de gestação, nota-se que a exatidão do método atinge a 91,55% e alcança a 93,5% caso se faça com relação às três provas falso - positivas as mesmas considerações feitas para o período anteriormente descrito.

No referente à percentagem de eficácia do teste por nós obtida, convém assinalar que a mesma deriva da totalidade das bufo-reações efetuadas, isto é, mesmo as realizadas no início dos trabalhos, quando, por não se acharem ainda delineados os fundamentos do teste, incorremos em alguns erros.

Para isso testemunhar, procuramos separar do total dos resultados, os referentes a um único Haras, no qual, nestes últimos anos, vem a prova sendo elaborada com todo rigor da técnica.

Assim sendo, em 263 bufo-reações referentes a 83 éguas, alcançamos os seguintes resultados:

Positivas confirmadas:	223
Negativas confirmadas:	35
Falso - Positivas:	1
Falso - Negativas:	4

Verifica-se que a eficácia do teste alcançou, nesse Haras, a cifra de 98,09 por cento, valor este que dispensa comentários. O reduzido número de reações falso-positivas salienta o ótimo estado reprodutivo das éguas em estudo.

4. S U M M A R Y

The results with the utilization of the male toad test for the diagnosis of pregnancy in the Thoroughbred mare, during fifteen breeding season, were described.

The experiments were performed on male toads (*Bufo marinus* L. and *Bufo paracnemis* Lutz) varying in weight from 90 to 320 g.

Galli Mainini's technique with some modification was used.

Blood serum samples were drawn from 313 mares thirty-six to 120 days following the date of the last breeding.

A single mare-serum injection of 12 to 15 ml was given subcutaneously into the latero-caudal lymph sac of the toad. Two toads were used for each test.

Positive reactions, characterized by spermatozoa found in toad's urine, had resulted mainly within three to six hours.

As reasonable but not strict aseptic procedures followed the collection of the blood-serum samples, some investigations were undertaken, (a) with putrid positive serum and (b) with positive serum sample preserved by the addition of sodium mercuric iodide in the proportion of 1:10.000 or sodium sulfatiazol in the concentration of 0,2 per cent.

In (a) all the toads gave positive results and a great number of them died about 24 hours after the injection.

In (b), after 13 months of conservation, all the samples gave also positive results, and were not toxic for the toads.

Of the 782 test that were performed, 593 positive and 150 negative reactions were in agreement. Among the results not in agreement, 15 were false positives and 24 were false negatives. Eleven of these false negatives reactions resulted from blood-serum samples collected too early (before the 43rd day), or too late (after the 98th day), for detecting gonadotrophic hormones, and the early reactions could not be retested.

The accuracy of the toad test realized with serum samples collected between 45 to 90 days - the proper time for the test - was of 96,35 per cent. In this period both 11 false

positives and false negatives reaction were observed. So, if the false positives reactions were not computed as an error of the test, its efficiency would be of 98,17 per cent.

An efficiency of 91,55 per cent were obtained with the reactions performed with blood samples collected between 36 to 45 days after the last breeding, that is at an early time, during which a pregnant mare could give a false negative test. In this period, of the 154 tests performed, ten were false negatives, and could not be also retested.

However, the percentage of accuracy would be higher if the toad test had been better managed, and the blood samples collected at the proper time.

So, of the 263 male toad tests wich have been well performed during the last five years, from blood samples of 83 mares, pertaining to the same stud. the following results were obtained: 258 in agreement, one false positive and four false negative. In this case the efficiency of the test was of 98,09 per cent.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. - SCHWEITZER, F.L. - BAS, J.A. - 1948 - Nueva reacción diagnóstica de la preñez de yeguas utilizando el sapo macho. Rev. Soc. argent. Biol., 10:23-28

2. - TABARELLI Neto, J.F. - 1949 - The reaction of the male toad to pregnant mare's serum and its comparative study with the Cole-Hart test. Amer. J. vet. Res., 10:74-76

3. - TABARELLI Neto, J.F. - 1953 - Do emprêgo da bufo-reação no diagnóstico precoce da prenhez na égua puro sangue inglês. Tese. Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo. São Paulo

4. - DEL PERO, R. - 1948 - La prova di Galli-Mainini nella diagnosi precoce di gravidanza nella cavalla. Profilassi, 21:89-92

5. - HINGLAIS, H. - HINGLAIS, M. - 1948 - Emploi de la grenouille mâle adulte indigène pour la recherche et éventuellement le dosage des gonadotrophines hypophysaires ou chorioniques. Application - au bio-diagnostic de la gestation chez la femme et chez la jument. C.R. Acad. Sci., Paris 226: 1041-1043

6. - MAYER, H.F. - GOVI, L. - FLORES, J.F. - 1948 - Contribución a la reacción de Galli Mainini utilizando el *Bufo paracnemis* Lutz. Corrientes, Imprenta de la Universidad Nacional del Litoral

7. - CASTELLI, F. - 1949 - La prova di Galli-Mainini sul maschio di *Rana esculenta* nella diagnosi di gravidanza della cavalla. Nota preventiva. Nuova Vet., 25:6-10

8. - PUJOL, H.J. - 1949 - La reacción de Galli Mainini aplicada a la yegua. *Veterinaria, Madr.*, 13:791-796
9. - BRAZEL, E. - 1950 - Neuer, beschleunigter Trächtigkeitserkennungsnachweis bei Stuten. *Dtsch. tierärztl. Wschr.*, 57:62-65
10. - PEDRAZA, E.B. - 1953 - El diagnóstico de la gestación en la yegua e en la vaca. Madrid, Altamira S.A.
11. - CALISTI, V. - 1950 - La reazione di Galli-Mainini sulla *Rana esculenta* nella diagnosi di gravidanza dell'asina confronti con la reazione di Friedman. *Boll. Soc. zootach.* 63 (1):13-19
12. - WOHLZOGEN, F. - 1950 - Quantitative Untersuchungen über die Reaktion der männlichen Wechselkröte (*Bufo viridis*) auf Stutenurongonadotropin. *Wien. tierärztl. Mschr.* (37):394
In, Veterinärmedizin, 3 (2):183.
13. - SATO, Y. - MURAMATSU, T. - 1950 - Ejaculation of the male *Rana nigromaculata* Hallowell, resulting from other causes than prolactin. *Bull. Coll. Agric. Utsunomiya Univ.*, 5:231-238
14. - BENTZ, H. - 1951 - Einheimische Frösche als Testtiere beim Schwangerschaftsnachweis der Stute. *Berl. Münch. tierärztl. Wschr.*, (8):157-161

15. - SABROSO, H. - 1951 - La prueba del sapo en el diagnóstico de preñez de la yegua. Rev. Fac. Med. vet. Lima, 6:200-215. In Anim. Breed. Abstr., 21:129
16. - JUHÁSZ, B. - DÓZSA, L. - 1950 - Schwangerschaftsreaktion am Frosch zur Feststellung der Trächtigkeit bei Stuten. Schweiz. Arch. tierheilk., 92:178-182. In Acta vet. hung. 1:145-148, 1951
17. - OSSWALD, R.H. - 1951 - Pregnancy diagnosis in the mare with *R. esculenta*. In Anim. Breed. Abstr., 21:24
18. - RAULLET, J. - 1951 - Diagnostic de gestation chez la jument. These - École Nationale Veterinaire D'Alfort. Paris
19. - BIELANSKY, W. - PIGONIDWA, H. - EWY, Z. - 1954 - The value of the sperm production test for use in the diagnosis of pregnancy in various breeds of horses. In Anim. Breed. Abstr., 22: 35
20. - SAKUMA, Y. - 1952 - The semen excretion test of male batrachia for the diagnosis of early pregnancy in mare. Tohoku J. Agric. Res. 3 (1):69-81. In Anim. Breed. Abstr., 22: 437, 1954
21. - GALO, P. - CARRILLO M., I. - PEREZ MATHEUS, R. - 1952 - Contribucion al estudio del diagnostico del embarazo en la yegua utilizando el sapo *Bufo marinus* - Comparacion con prueba de Cole y Hart. Rev. Med. vet., Caracas, 11 (3-4): 105-113

22. - BERRY, R.O. - SPALDING, J.F. - 1952 - A pregnancy test for mares using the male toad (*Bufo*). *J. Anim. Sci.*, 11 (4) : 788-789
23. - SUÑER, J.P. - 1953 - La reacción de Galli Mainini en el diagnóstico precoz de la gestación en la especie equina. *Zootria*, 3 (9):28-35
24. - CUBONI, E. - 1953 - La diagnosi precoce di gravidanza nella cavalla mediante la prova sulla *Rana esculenta* maschio. *Clin. vet.*, Milano, 76 (1):1-16
25. - MORALES, C.C. - DAMONTE, F.R. - 1954 - La reaccion de Galli Mainini en el diagnostico de la gestacion en las yeguas. *Gac. vet.*, B. Aires, 16 (9):171-177
26. - McMANAMNY, L.S. - MURNANE, D. - FULLAR, E.M. - 1959 - A comparison of a modified Aschheim - Zondek, and the toad (*Bufo marianus*) test in equine pregnancy diagnosis. *Aust. vet. J.*, 35 (2):29-37
27. - SANSONOVA, V.M. - 1961 - Male *Rana ridibunda* for diagnosing pregnancy in mares. *In Anim. Breed. Abstr.*, 29:146
28. - CHIEFFI, A. - GOUVEIA, P.F. - REIS J.M. - KALIL, E.B. - 1962 - Eficiência da bufo-reação, no reconhecimento precoce da gestação, em éguas puro sangue inglês. *Turf e Fomento*, S. Paulo, 2 (out.):1-14

29. - MAININI, C. Galli - 1948 - El diagnóstico del embarazo con batracios machos. Buenos Aires, Editorial Impaglione - Artecnicca
30. - VALLE, J.R. - PARAVENTI, H.A. - 1950 - Comentários sobre duas provas recentes para o diagnóstico biológico da gravidez. Rev. paul. Med., 36:319-326
31. - BURGOS, M.H. - MANCINI, R.E. - 1948 - Ciclo espermatogénico anual del *Bufo arenarum* Hensel. Rev. Soc. argent. Biol., 24:328-336
32. - JOVEN, L. Libertad - SANTAMARINA, E. - 1960 - A twenty four-hour biologic test for pregnancy in the mare. Zootechnia, Madr., 2 (1):30-39
33. - SANTAMARINA, E. - JOVEN L. Libertad - 1960 - The effect of time and temperature on the gonadotrophic potency of pregnant mare serum. Amer. J. vet. Res., 21 (83):585-590
34. - SANTAMARINA, E. - JOVEN L. Libertad - 1960 - Factors influencing accuracy of a gonadotrophin test for pregnancy in mares. J. Amer. vet. med. Ass., 137 (9):522-524
35. - GOSS, H. - COLE, H.H. - 1931 - Sex hormones in the blood serum of mares. III. Some chemical properties of the ovary-stimulating principles. Endocrinology, 15:214-224

36. - COLE, H.H. - 1937 - Hormones concerned with reproduction, their use as therapeutic agents and in pregnancy diagnosis. Univ. Pa. Bull. 37:4-20
37. - ARNOLD, J. - 1937 - A rabbit ovulation test for equine pregnancy. (Report of the second and third years work). Vet. Med., 32:324-327
38. - SACHWEH, P. - 1943 - Anterior pituitary hormone in the serum of pregnant mares. Tierärztl. Rdsch. 49:1-4 In Vet. Bull., 18:33, 1948
39. - CUBONI, E. - 1949 - La diagnosi di gravidanza negli animali mediante le reazioni biologiche e chimico-ormonali. Milano, Istituto Sieroterapico Milanese S. Belfanti
40. - TABARELLI, J.F., NETO - SALLES GOMES, C.E. - FERNANDES FILHO, M. - 1954 - Actividad gametocinética del ácido oxálico y de los oxalatos de potasio, sodio y amonio en el sapo macho (*Bufo marinus* L. y *Bufo paracnemis* Lutz). Rev. Soc. argent. Biol., 30 (6/8):233-240
41. - COLE, H.H. - HART, G.H. - 1930 - The potency of blood serum of mares in progressive stages of pregnancy in effecting the sexual maturity of the immature rat. Amer. J. Physiol., 93:57-68