

DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
Diretor: Prof. Dr. Oziel Bizutti

EMPRÊGO DA BUFO-REAÇÃO E DA PROVA DA HIPEREMIA
OVARIANA NO DIAGNÓSTICO DA PREENHEZ NA JUMENTA
E NA ÉGUA COBERTAS POR JUMENTO

(UTILIZATION OF THE MALE TOAD AND OVARIAN HYPEREMIA
TESTS IN THE DIAGNOSIS OF PREGNANCY IN THE FEMALE ASSES
AND MARES BRED TO A JACK)

OZIEL BIZUTTI
Prof. Assistente Doutor

F. R. A. PERDIGÃO DE OLIVEIRA *

J. F. SOUZA LEÃO *

E. B. MARCHI *

A importância, sobejamente conhecida, do diagnóstico da prenhez, sobretudo se precoce, fez com que grande número de pesquisadores se interessasse pela aplicação, em veterinária, dos métodos hormonais empregados com sucesso, no diagnóstico da gestação na mulher.

Assim sendo, em veterinária, as chamadas provas de laboratório, notadamente para espécies de grande porte, baseadas na investigação hormonal de certos humores orgânicos, tem emprêgo prático principalmente entre alguns representantes da família *Equidae*.

SVECIN (13) e SAMODELKIN (12) sugeriram a existência de uma gonadotrofia sérica, (P.M.S. Pregnant Mare Serum) na jumenta, comparável à da égua, e associada com a prenhez.

SVECIN (13) empregando a prova de Aschheim-Zondek, observou alto grau de eficiência com amostras de sôro colhidas entre o 51.º e 150.º dia após o acasalamento; SAMODELKIN (12) aplicando o mesmo teste, obteve 14 resultados falso-negativos de um total de 47 provas. VALLE (17), com a reação da hiperemia ovariana em rata imatura, registrou resultados concordantes em quatro jumentas.

CALISTS (5), AJELLO (1), CHICCHINI e CHIACCIARINI (7) desenvolvendo o método usual de Friedman, relataram bons resultados.

* Veterinários da Divisão de Zootecnia e Nutrição Animal do Departamento da Produção Animal — São Paulo.

Saliente-se que os autores, por último citados, injetavam as amostras do sôro diretamente no ovário da coelha.

Todavia, a prova de Galli-Mainini (Bufo-reação), de valor comprovado para o diagnóstico da prenhez na égua, empregando-se, sobretudo, como animal teste, machos da família *Bufo* (TABARELLI e col. (16)), não tem revelado a mesma eficiência quando aplicada no diagnóstico daquela condição na jumenta. Assim, BRATANOV (4) e CALISTI (5), obtiveram grande número de resultados falso-negativos, utilizando exemplares da família *Rana*; CHIEFFI e col. (8), observaram 133 bufo-reações negativas, com sôro sanguíneo colhido entre o 90º e o 150º dia da prenhez comprovada em 25 jumentas, empregando como animais de prova, machos da espécie *Bufo marinus* L.

Quanto aos dados descritos em éguas fecundadas por jumento, VITTOZ (18) ao analisar, pelo teste de Friedman, amostras de sôro colhidas, em média, no 65.º dia da prenhez, obteve 42% de êrro. BIELANSKI e col. (2 e 3), em inúmeras provas consignaram, exclusivamente, resultados falso-negativos pela bufo-reação efetuada com machos do gênero *Rana*; CALISTI e OLIVA (6) relataram 100% de resultados falso-negativos, à prova de Friedman entre o 55.º e o 130.º dia da gestação. Contudo, em 16 jumentas fecundadas por garanhão, observaram, tão somente, quatro reações falso-negativas.

PIGONIOWA (10) e CLEGG e col. (9), investigando acêrca das diferenças na concentração da gonadotrofina sérica em éguas após salto fértil, seja com garanhão, seja com jumento, verificaram títulos hormonais muito mais elevados nas fêmeas do primeiro grupo.

CLEGG e col. (9) admitem que o genótipo do feto influi sôbre a atividade secretora das cúpulas endometriais.

Na primeira parte dêste trabalho, apresentamos os resultados iniciais do estudo que vimos efetuando acêrca do diagnóstico da prenhez na jumenta, e na segunda parte, os obtidos no diagnóstico da prenhez na água coberta por jumento, pela pesquisa da gonadotrofina sérica, usando-se, simultâneamente dois testes, a saber: o da bufo-reação e o da hiperemia ovariana em ratas imaturas.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de sôro: Para a primeira parte do experimento, o sangue foi obtido de 34 jumentas das raças italiana e brasileira. O número de dias decorridos entre a última cobertura e a coleta referida, oscilou entre 38 (mínimo) e 107 (máximo), efetuando-se 96 bufo-reações e 100 testes de hiperemia ovariana para a obtenção de 44 diagnósticos. Em algumas jumentas, as provas foram repetidas em períodos mais avançados da prenhez. Para a segunda parte

foram utilizadas 16 éguas de várias raças, cobertas por jumento. Realizaram-se 34 bufo-reações e 34 testes de hiperemia ovariana, com amostras de soro colhidas entre o 39.º e o 97.º dia do acasalamento, para um total de 20 diagnósticos.

As amostras de sangue, retiradas da veia jugular, eram mantidas em frascos de vidro limpos e secos dos quais, após a retração do coágulo, era o soro removido para a prova ou conservação em congelador.

Técnica da hiperemia ovariana: O soro foi injetado pela via subcutânea, na dose de 2,5 ml, em ratas imaturas pesando entre 35-50 g e sacrificadas 48 horas após a injeção. Os ovários eram examinados à luz do dia e a resposta considerada positiva, quando se apresentavam aumentados de volume e fortemente hiperêmicos, isto é, com cor comparável à do rim ou do baço.

O teste negativo era indicado pela presença de ovários pequenos e pálidos.

Técnica da bufo-reação: A bufo-reação foi desenvolvida segundo técnica preconizada por TABARELLI e col. (16), empregando-se como animal de prova, sapos machos da espécie *Bufo marinus* L.

Contra-provas dos resultados obtidos pelos testes: Foram efetuadas as seguintes: a) pelo parto ou sua ausência; b) pela volta do cio; c) pelo abôrto.

RESULTADOS

Diagnóstico da prenhez na jumenta: Com relação ao emprêgo simultâneo da bufo-reação e do teste da hiperemia ovariana em ratas imaturas apresentam-se, na Tabela I, os resultados referentes ao total de provas efetuadas em 34 fêmeas. Seu exame evidencia a ineficácia da bufo-reação, cujas respostas foram sempre negativas, 52 das quais, discordantes.

TABELA I — Testes da hiperemia ovariana e bufo-reação efetuados em 34 jumentas.

Teste	Desfecho Resultado	Concordante		Discordante		Total
		positivo	negativo	falso positivo	falso negativo	
Hiperemia ovariana		41	44	10	5	100
Bufo-reação		0	44	0	52	96
Total		41	88	10	57	196

O teste da hiperemia ovariana por outro lado, mostrou-se mais sensível que o anterior. Pela análise da Tabela II, onde se registram os 44 diagnósticos obtidos nas 34 jumentas, com as 100 provas executadas, verifica-se segurança de aproximadamente 81%, assinalando-se cinco resultados falso-negativos e três falso-positivos. Estes últimos, obtidos com amostras de sôro colhidas no 43.º, 49.º e 43.º dia da suposta prenhez, respectivamente.

TABELA II — Valor do teste da hiperemia ovariana segundo seu resultado e a comprovação ou não da prenhez em 34 jumentas

Resultados	Gestação		Total
	Comprovada	Não comprovada	
Positivos	15	5 (*)	20
Negativos	3 (**)	21	24
Total	18	26	44

(*) = falso positivos

(**) = falso negativos

% de segurança do teste = 81%

Diagnóstico da prenhez na égua coberta por jumento: A Tabela III indica os resultados concernentes, ao total de provas desenvolvidas em 16 éguas servidas por jumento. Nota-se que a bufo-reação teve comportamento semelhante ao observador no grupo anterior, isto é, respostas exclusivamente negativas, 15 das quais, discordantes.

TABELA III — Testes da hiperemia ovariana e bufo-reação efetuados em 16 éguas cobertas por jumento

Teste	Desfecho Resultado	Concordante		Discordante		Total
		positivo	negativo	falso positivo	falso negativo	
Hiperemia ovariana		3	19	0	12	34
Bufo-reação		0	19	0	15	34
Total		3	38	0	27	68

Por sua vez, o teste da hiperemia ovariana não revelou a mesma eficiência demonstrada no lote das jumentas. Pelo exame da Tabela IV, que assinala os 20 diagnósticos efetuados nas 16 éguas

garanhão, seja por jumento. O primeiro autor, revelou as seguintes diferenças nos teores hormonais: (a) na égua servida por garanhão, de 56 a 112 UI/ml de sôro e (b) na égua coberta por jumento, de 2 a 20 UI/ml de sôro. Para o segundo autor, na condição (b), não só a concentração da gonadotrofina no sôro correspondia a 1/10 da assinalada na condição (a), como também era baixa a potência hormonal, seja da secreção, seja do próprio tecido constituinte das cúpulas endometriais, local onde a referida gonadotrofina parece ser elaborada nos *Perissodactyla*. Consideraram ainda, CLEGG e col. (9), que a atividade secretora das cúpulas aludidas seria influenciada pelo genótipo do feto.

Por outro lado, os resultados obtidos com o teste da hiperemia ovariana na jumenta (Tabela II) demonstram, apesar do número ainda reduzido de observações, índice de segurança bastante promissor (81%), muito embora se situe aquém do conseguido com o mesmo teste em éguas cobertas por garanhão (97,6%), conforme relato de TABARELLI e FERNANDES (15). Neste último trabalho, no qual se efetuou estudo comparativo entre o teste da hiperemia ovariana e a bufo-reação, o primeiro mostrou-se mais sensível que o segundo. Ainda no fator sensibilidade, ao que tudo indica, residem os resultados relativamente bons, assinalados por CALISTI (5), AJELLO (1) e CHICCHINI e CHIACCHIARINI (7) com a prova de Friedman e por SVECIN (13) com o teste de Aschheim-Zondek, no diagnóstico da gestação na jumenta. Assim o julgamos, pelo fato de TABARELLI (14) ter revelado ser a prova de Friedman mais sensível que a bufo-reação, quando utilizada no diagnóstico da prenhez da égua servida por garanhão.

Foi pouco eficiente o resultado conseguido, também com o teste da hiperemia ovariana, em éguas fecundadas por jumento (Tabela IV). Tendo-se registrado um único teste positivo comprovado e sete falso-negativos, num total reduzido de 20 diagnósticos, acreditamos que o índice de segurança assinalado de 65% não exprima um valor real. Supomos mesmo que, diante de um número maior de observações, as possibilidades de erro, com o método, serão mais elevadas.

Considerando-se os trabalhos já citados de PIGONIOWA e de CLEGG e col., a aludida ineficiência poderia relacionar-se com o fator concentração.

Assim sendo, a presença na égua de um feto híbrido concorreria, para que os teores em gonadotrofina sérica, atingissem níveis inferiores aos manifestados pela própria jumenta. Convém lembrar que, em cruzamentos inter-específicos — (égua x jumento) — e empregando o teste de Friedman obtiveram, VITTOZ (18) 42% de erro e CALISTI e OLIVA (6), 100% de resultados falso negativos. Contudo, é interessante frisar que estes últimos autores

observaram eficiência igual a 75%, na jumenta coberta por garanhão, com a mesma prova.

Concluindo, a ineficácia total do emprêgo da bufo-reação no diagnóstico da prenhez, seja na jumenta, seja na égua cobertas por jumento, parece estar na dependência de dois fatores negativos, a saber: (a) menor concentração em gonadotrofina no sôro sanguíneo da fêmea prenhe e (b) animal de prova (sapo) — menos sensível ao referido hormônio.

No que diz respeito ao teste de hiperemia ovariana, nos cruzamentos inter-específicos — (égua x jumento) —, a taxa de gonadotrofina no sangue da gestante, situar-se-ia aquém do nível limiar suscetível de sensibilizar o ovário da rata imatura.

A relação inversa entre o tamanho corporal e a capacidade em secretar gonadotrofina sérica, assinalada entre animais da espécie *E. caballus*, ROWLANDS (11), parece não atingir os representantes da espécie *E. asinus*, sobretudo se levamos em consideração as diferenças de porte entre égua e jumenta.

SUMMARY

The results with the utilization of the male toad and ovarian hyperemia tests for the diagnosis of pregnancy in she-asses and mares bred to a jack were described.

In the studies with she-asses, 96 male toad tests, performed on *Bufo marinus* L., and 100 ovarian hyperemia tests in the immature rat, with blood drawn from 34 females 38 to 107 day following the date of the last breeding, were carried out simultaneously.

With the male toad test only negative results could be obtained. So, of 96 tests, 44 were in agreement (not pregnant) and 52 not in agreement (false-negative reactions). These results proved the inefficiency of the test as a mean for the detection of pregnancy in she-asses. However, the accuracy was better with the ovarian hyperemia test; of 100 reactions, 85 were in agreement (41 positive and 44 negative) and 15 were not in agreement (10 false positive and 5 false negative).

In the work with mares bred to a jack, 34 male toad tests and 34 ovarian hyperemia tests, with blood drawn from 16 females 39 to 97 day following the date of the last breeding, were also carried out simultaneously.

The results proved the inefficiency of both tests. Of the 34 male toad reactions, 19 were negative and in agreement and 15 were false-negative; no positive result could also be shown. Of the 34 ovarian hyperemia tests, 22 were in agreement (3 positive and 19 negative) and 12 not in agreement (all false negative).

These results appear to indicate that gonadotrophin is secreted at a reduced level, not only in pregnant she-asses but also in mares bred to a jack, as has been reported by other authors.

The male toat test appeared to be less sensible to gonadotrophin than the ovarian hyperemia test in immature rat.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AJELLO, P. — La diagnosi di gravidanza nel l'asina mediante la reazione di Friedman sul sangue. *Clin. Vet.*, Milano, 73:144, 1950.
2. BIELANSKI, W.; EWY, Z.; PIGONIOWA, H. — Diferenças relacionadas com o aparecimento do hormônio gonadotrófico no sangue de éguas prenhes cobertas por garanhão e por jumento. (Título original, em russo). *Bull. Acad. pol. Sci.*, Polska, 3:39, 1955.
3. BIELANSKI, W.; EWY, Z. PIGONIOWA, H. — Differences in the level of gonadotrophins in the serum of pregnant mares. Papers 3rd Int. Congr. Anin. Reprod. Sect. 1:110, Cambridge, 1956.
4. BRATANOV, P. P. — Diagnosis of early pregnancy using *R. esculenta ridibunda* and *R. temporaria, agillis, graeca* and *B. virillis*. In: *Anim. Breed. Abst.*, 17:422, 1949.
5. CALISTI, V. — La reazione di Galli-Mainini sulla *Rana esculenta* nella diagnosi di gravidanza dell'asina. Confronti con la reazione di Friedman. *Boll. Soc. Eustachiana, Ist. Sci. Uni. Camerino*, 43:13, 1950.
6. CALISTI, V. & OLIVA, O. — La reazione di Friedman nella cavalla e nell'asina gravide per accoppiamento interespecifico. *Clin. Vet.*, Milano, 80:65, 1957.
7. CHICCHINI, U. & CHIACCHIARINI, P. — L'iniezione intraovarica di siero di sangue di cavalla e di asina nella reazione di Friedman. *Atti. Soc. Ital. Sci. Vet.*, Faenza 16:177, 1962.
8. CHIEFFI, A.; GOUVEIA, P.; SOUZA LEÃO, J.; MARCHI, E. & MARQUES DOS REIS, J. — Inefficiency of the bufo-reaction tests as proof of the early detection of pregnancy in the female asses. *V. Congr. Intern. Riprod. Animul. Fec. Art.*, Sezione II, 19: 21. Trento, 6-13 Sett., 1964. *Bol. Ind. Animul*, S. Paulo, 22 (N.S.):57, 1964.
9. CLEGG, M. T.; COLE, H. H.; HOWARD, C. B. & PIGEON, H. — The influence of foetal genotype on equine gonadotrophin secretion. *J. Endocrin.*, London, 25:245, 1962.
10. PIGONIOWA, H. — Investigation on the secretion of gonadotrophin hormones in pregnant mares. In: *Anim. Breed. Abst.*, 31:314, 1963.
11. ROWLANDS, I. W. — Levels of gonadotrophins in tissues and fluids with emphasis on domestic animals. Gonadotrophins. Their chemical and biological properties and secretory control, pp. 74. The Sixth Annual Reproduction Symposium, August 13, 1963, Oregon St. Univ. Corvallis. Ed. H. H. Cole. W. H. Freeman and Co. S. Francisco. London, 1964.

12. SAMODELKIN, P. A. — The hormonal methods of pregnancy diagnosis in the she-asses. *Vosprosy Plodov. Rabotosp. Losād. Moscow, Seljhozgiz*: 100, 1939 In: *Anim. Breed. Abst.*, 8:225, 1940.
13. SVECIN, K. B. — Hormonic methods of pregnancy diagnosis in the ass. *Sovetsk. Vet.*, 3:107, 1939. In: *Anim. Breed. Abst.*, 8:344, 1940.
14. TABARELLI NETO, J. F. — Do emprêgo da bufo-reação no diagnóstico precoce da prenhez na égua puro sangue inglês. Tese. S. Paulo, Brasil, 1953.
15. TABARELLI NETO, J. F. & FERNANDES FILHIO, M. — O diagnóstico da prenhez na égua puro sangue inglês pela prova da hiperemia ovariana. Seu contrôle pela bufo-reação e prova química de Cuboni. *Rev. Fac. Med. vet.*, São Paulo, 6:9, 1957.
16. TABARELLI NETO, J. F. REINER, U. R.; PEREIRA LIMA, F. S. & BIZUTTI, O. — Bufo-reação no diagnóstico precoce da prenhez na égua puro sangue inglês. Resultados do seu emprêgo durante quinze estações de monta. *Rev. Fac. Med. vet.*, São Paulo, 7:43, 1963-64.
17. VALLE, J. R. — Ovarian hyperemia in the immature rat as a pregnancy test in equids. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, N.Y. 66:352, 1947.
18. VITTOZ, J. — Diagnostic de la gestation chez les juments. Valeur de la reaction de Friedman et de la réaction du Cuboni. *Rec. Med. Vet.*, Paris 131:1111, 1955.