

Utilização de Glicoproteínas Associadas à Prenhez (PAGs) para entender e melhorar resultados de fertilidade em bovinos

Pohler, K.G., Reese, S.R. & Araujo, G.F.

Department of Animal Science, University of Tennessee, Knoxville, TN

Correspondência para autor: kpohler@utk.edu

Pontos Chave:

O diagnóstico de prenhez em uma amostra de sangue permite a detecção mais precoce de vacas não prenhes do que a palpação retal feita após a inseminação ou a transferência de embrião

O diagnóstico de prenhez usando PAG é um método eficiente que tem como base a detecção da presença de uma proteína específica da prenhez

O teste PAG está comercialmente disponível tanto para sangue como para leite

O teste PAG pode ser uma ferramenta útil para a detecção de prenhez que tenham alta probabilidade de sofrer mortalidade embrionária tardia

Introdução:

A falha reprodutiva é uma das barreiras mais importantes para a rentabilidade dos rebanhos. Questões de manejo, infertilidade da vaca, infertilidade do touro, estresse térmico e mortalidade embrionária são fatores que contribuem para a ineficiência reprodutiva. O rebanho de corte brasileiro tem mais de 70 milhões de vacas, e a mortalidade embrionária representa uma perda de quase 4 bilhões de reais/ano⁽¹⁾. O Brasil tem estado na vanguarda da adoção de tecnologias reprodutivas, incluindo inseminação artificial em tempo fixo (IATF), sincronização de estro (SE), produção de embriões in vitro (PIV), testes de prenhez e testes de prenhez com base em químicos (PAGs), como forma de aumentar o progresso genético do rebanho de corte nacional. No Brasil, as vendas de sêmen de touros de corte aumentaram de 3,3 milhões de unidades em 1993 para 11,9 milhões de unidades em 2011⁽²⁾. Do rebanho de corte total, entre 11 e 12% está sendo inseminado por IA, o que equivale a 5,5 milhões de vacas, a maior proporção do mundo⁽³⁾. Ainda que estas tecnologias tenham numerosos benefícios, os produtores precisam dedicar tempo e recursos de mão de obra para sua completa implantação. No protocolo tradicional de detecção de estro é necessário fazer o monitoramento duas vezes por dia por longos períodos de tempo e exclui da inseminação os animais que não mostram estro. A inseminação em tempo fixo e os protocolos de SE elaborados para uso em sincronização em tempo fixo têm sido usados com resultados similares aos da detecção de estro para IA com

XX Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos

menos informações. Posteriormente, a adoção de protocolos IATF aumentou entre os produtores. A pergunta é: “Como nós, os produtores, podemos aumentar ainda mais as taxas de prenhez com uma única inseminação ou aumentar a eficiência reprodutiva?” A resposta para esta pergunta não é tão fácil, e tem resultado em novas pesquisas sobre como aumentar a maturidade do folículo dominante, aumentar a competência do oócito, melhorar o ambiente uterino e promover a saúde da placenta, entre outros. O nosso grupo escolheu explorar o uso de PAGs (teste de prenhez com base em substância química) para aumentar a eficiência reprodutiva em bovinos.

PAGs maternos circulantes como ferramentas para o manejo reprodutivo de bovinos

PAGs e estabelecimento de prenhez:

Múltiplos testes (como RIA e ELISA) podem ser usados na detecção dos membros da moderna família PAG na circulação materna, começando logo após a formação da célula binucleada (dia 19-20 da gestação)⁽⁶⁾ até poucos dias depois do parto (**Figura 1**).^(7,8) As concentrações circulantes de PAGs bovinos podem ser influenciadas por uma série de fatores, incluindo raça, peso, número de parições da fêmea, sexo do feto, número de fetos e peso do feto ao nascer, juntamente com o estágio e status da prenhez.^(9,10) No entanto, o papel que as PAGs desempenham durante a prenhez continua indefinido.

Até o momento, não há funções claramente relacionadas às PAGs. Foi demonstrado, entretanto, que as PAGs inibem diferentes células imunológicas *in vitro* e que podem camuflar antígenos fetais/placentários em relação ao sistema imunológico.⁽²³⁾ A maior parte dos trabalhos feitos com PAGs focaram o desenvolvimento de uma ferramenta confiável para diagnosticar a prenhez em múltiplas espécies de ruminantes, incluindo bovinos, ovinos, caprinos, búfalos, bisões e alces.⁽¹¹⁾ Em comparação com outros métodos de detecção de prenhez em bovinos, as PAGs têm uma característica singular porque são proteínas específicas da prenhez. PAG1 (também conhecida como proteína B específica da prenhez, PSPB) tem sido a PAG de maior interesse em relação ao diagnóstico precoce da prenhez, por causa de sua capacidade de detectar PAG1 na circulação materna durante toda a gestação.^(7,12) Green et al. ⁽¹³⁾ no entanto, enfatizaram duas desvantagens do uso de PAG1 para detecção da prenhez: 1) os diagnósticos de prenhez poderiam estar comprometidos no primeiro mês da prenhez por causa da concentração circulante de PAG1 baixa e variável, e 2) a longa meia-vida destas proteínas (~8 dias) na circulação materna depois do parto ou da perda fetal. Por causa destas preocupações, tem havido interesse na detecção de outras PAGs para a detecção da prenhez. Green et al. ⁽⁸⁾ relataram o estabelecimento de um teste baseado em ELISA para PAGs no início da prenhez, com uma meia-vida relativamente curta (4,3 dias). Também foi demonstrado que, nos bovinos, as concentrações circulantes de PAG têm um primeiro aumento significativo em torno do dia 24 da gestação, seguido por aumento passageiro até a parição,^(8, 14) que é semelhante ao do de outros pequenos ruminantes. Em estudo anterior, as PAGs foram detectadas em todos os bovinos no dia 28 da gestação, alcançando um pico em torno do momento da parição. Depois da parição, as PAGs tornaram-se indetectáveis oito semanas depois do parto em 38 das 40 vacas, concluindo-se que a escolha de diferentes PAGs ajuda a superar a persistência da imunorreatividade à PAG ao longo

XX Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos

do período pós-parto. Depois de induzir a mortalidade embrionária em estudos similares, verificou-se que a meia-vida das concentrações circulantes de PAGs era de $35,8 \pm 21,9$ horas.⁽¹⁴⁾ Estas diferenças na meia-vida das PAGs são possivelmente resultado de diferentes formas da família PAG presentes em uma fase mais precoce da prenhez, quando comparado com o termo ou como resultado de diferentes mecanismos de clearance entre a fase inicial e a tardia da prenhez.

São três as plataformas comerciais de teste PAG atualmente disponíveis: (1) BioPRYN (BioTracking, LLC, Moscow, ID, EUA), (2) DG29 (Conception Animal Reproduction Technologies, Beaumont, QC, Canadá), e (3) Teste IDEXX de Prenhez Bovina (IDEXX Laboratories, Inc. Westbrook, ME, EUA). Está documentado que os atuais testes PAG diagnosticam a prenhez em bovinos com precisão, com média de acerto de 93 a 96%, tanto no sangue como no leite.^(8, 14-20)

PAGs como preditores de mortalidade embrionária tardia e como marcadores bioquímicos de função da placenta:

Em torno do momento de implantação do embrião no útero, a incidência de perda embrionária tardia/perda fetal precoce nos bovinos é de aproximadamente 4 a 10%.^(17, 23-27) A mortalidade embrionária tardia pode ter impacto econômico mais significativo por causa do atraso na data de concepção, que resulta em maior variação na data de nascimento e no peso dos bezerros.

Os mecanismos associados à perda reprodutiva em torno do momento da placentação são desconhecidos, mas podem estar associados a desenvolvimento ou função inadequados da placenta. Além da possibilidade de usar testes de PAG como ferramentas para a detecção da prenhez, as PAGs também servem como marcador para monitorar a viabilidade do embrião/feto, juntamente com a função da placenta. As vacas de corte, por exemplo, que levam a prenhez com sucesso até depois do dia 72 da gestação, têm concentrações circulantes de PAGs mais altas no dia 28 quando comparadas com as vacas que apresentam mortalidade embrionária fetal tardia, entre os dias 28 e 72 (usando um ELISA sanduíche).^(17, 26) Nos estudos anteriores, todas as vacas tinham um embrião com batimentos cardíacos no dia 28 da gestação. As que tinham sofrido mortalidade embrionária/fetal tardia depois do dia 28 e antes do dia 72, no entanto, tinham concentrações circulantes de PAGs mais baixas no dia 28. Dados similares foram relatados em vacas leiteiras^(23, 25, 28) e ovinos⁽²⁷⁾ em que as concentrações circulantes de PAGs eram maiores ou menores nos animais que mantinham ou tinham perdido uma prenhez, respectivamente. Ricci et al.,⁽¹⁷⁾ no entanto, relataram que as PAGs não eram preditivas de mortalidade embrionária tardia em bovinos leiteiros. A discrepância anterior na eficácia da utilização da concentração circulante de PAGs nos dias 28 a 30, para prever a mortalidade embrionária tardia em bovinos, pode ser explicada pelo teste PAG específico que foi utilizado. Parece não haver correlação entre o tamanho embrionário (comprimento crânio-caudal), largura do embrião ou volume embrionário no dia 35 ou 36 da prenhez em bovinos de corte, sugerindo que estas concentrações de PAGs mais baixas na circulação materna não são reflexo puramente de um embrião menor.

XX Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos

Um estudo recente demonstrou que bPAGs eram 96% mais precisas no diagnóstico de prenhez em vacas *Bos indicus*. Como ocorreu em estudos anteriores, usando o ELISA sanduíche em vacas *Bos taurus*, este teste poderia prever a mortalidade embrionária, com precisão, com base na diminuição da concentração de bPAG no dia 28 da prenhez (**Figuras 2 e 3**). A concentração de bPAG, no entanto, não pode explicar a perda de prenhez depois do dia 45 por causa de falha ovariana ou outra condição fisiológica⁽²⁹⁾. No início da prenhez, as concentrações de bPAG são mais altas em vacas *Bos indicus* do que vacas *Bos taurus* em estágios similares, ainda que o mecanismo seja desconhecido (**Figura 4**)^(29, 30). A concentração de PAG em vacas *Bos indicus* que mantiveram a prenhez era de 8 a 10 ng/ml mais alta do que em vacas *Bos taurus* que mantiveram a prenhez. Nas duas subespécies, entretanto, as vacas que sofreram mortalidade embrionária tinham níveis comparáveis de PAGs séricos. As novilhas também tinham concentração de PAG mais alta do que as vacas múltíparas, independente do peso corporal e volume sanguíneo⁽²⁹⁾.

Pohler et al⁽²⁹⁾ também estudaram o efeito da intensidade do estro sobre a concentração de bPAG. A intensidade era medida com a aplicação de um adesivo Estrotest, que mudava de cor com o maior número de montas por outros animais. Os animais que foram montados múltiplas vezes recebiam escores mais altos do adesivo do que os animais que não tinham sofrido montas. As vacas que apresentavam um estro mais intenso também tinham concentrações maiores de bPAG. As vacas que tinham escore de adesivo igual a 3 ou 4 tinham concentração estatisticamente mais alta do as vacas com escore 1 e 2, o que se correlacionou com taxas de prenhez mais altas nas vacas com maior expressão de bPAG (**Figura 5**).

Influência da fertilidade do touro sobre as PAGs na circulação materna

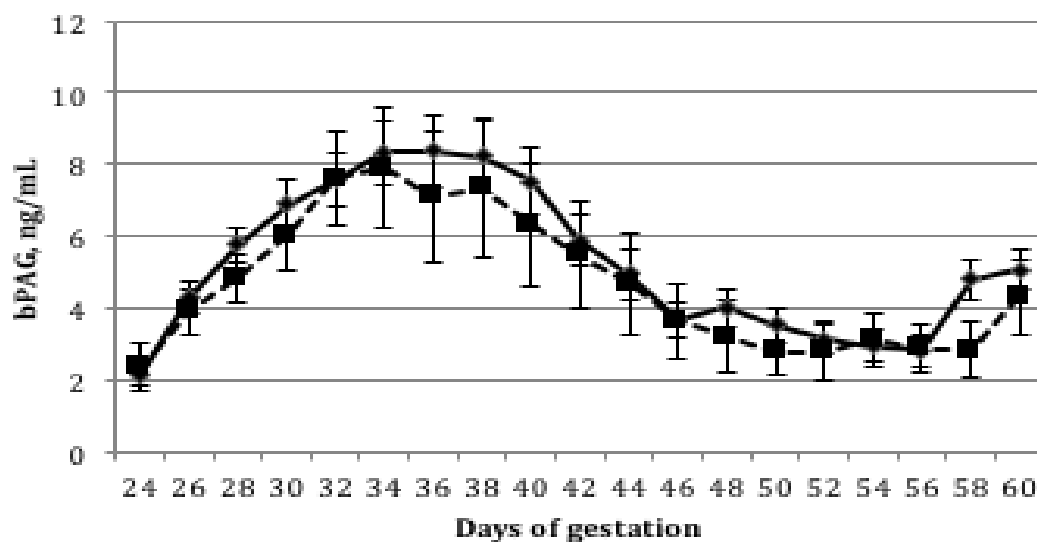
Foi demonstrado que o status e estágio da prenhez, raça, número de partições da fêmea, sexo e número de fetos, peso do feto ao nascer, peso da placenta, touro e muitos outros fatores têm algum grau de associação com as concentrações de bPAG^(9,10,14). Foram relatados dados limitados sobre os efeitos do touro sobre as concentrações de bPAG no início da prenhez. No entanto, com base na grande influência que o touro tem sobre o desenvolvimento da placenta estávamos interessados em examinar esta relação. Em geral, nos nossos estudos anteriores, não vimos nenhuma relação entre as concentrações circulantes de bPAGs e a fertilidade do touro, mas houve grande variação entre os touros e a produção de bPAG (**Figura 6**)⁽²⁹⁾. Além disso, três dos oito touros testados respondiam por 70% da mortalidade embrionária tardia relatada no subgrupo de vacas. O que surpreendeu foi que depois de retirar da análise todas as vacas que sofreram mortalidade embrionária tardia, depois do dia 28, estes três touros apresentaram concentrações circulantes de bPAG significativamente reduzidas quando comparados com os outros cinco touros do estudo (**Figura 7**). Considerados como um todo, estes dados sugerem que os touros influenciam os produtos BNC, como as bPAGs. Assim, os teores circulantes de bPAG podem servir como uma nova ferramenta para a identificação de touros de baixa fertilidade.

XX Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos

Resumo

O uso em ruminantes ungulados de um marcador bioquímico como a PAG pode proporcionar uma técnica poderosa para que o produtor identifique os animais prenhes, além de selecionar as vacas com maior probabilidade de sofrer perda embrionária/fetal, aumentando desta forma a eficiência reprodutiva. Como vimos que múltiplos fatores como status da paridade e o touro afetam as concentrações circulantes de bPAG no dia 28, os níveis circulantes de bPAG podem servir como nova ferramenta para identificar os touros de baixa fertilidade. Nossa atual hipótese de trabalho é que as PAGs liberadas para a circulação materna proporcionam uma ferramenta útil não apenas para identificar o status da prenhez, mas também a viabilidade do desenvolvimento da placenta e do embrião/feto (**Figura 8**).

A



B

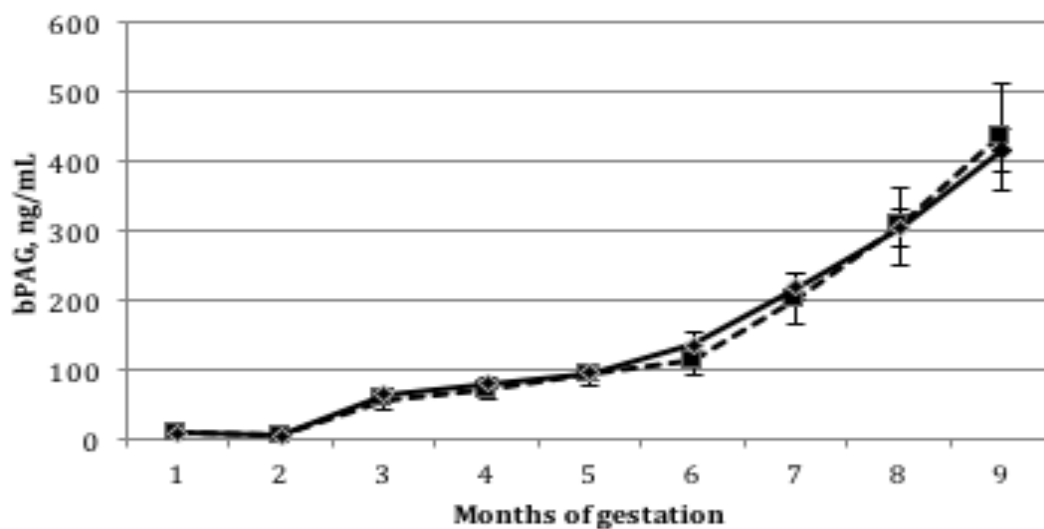


Figura 1. Concentrações circulantes de PAGs durante a prenhez em vacas de corte prenhes. O Gráfico A representa os primeiros 60 dias de prenhez e o Gráfico B o período todo de 9 meses de prenhez. É interessante que a queda no nível de PAG circulante em torno do dia 38 a 40 se repete em qualquer raça ou tipo de bovinos.

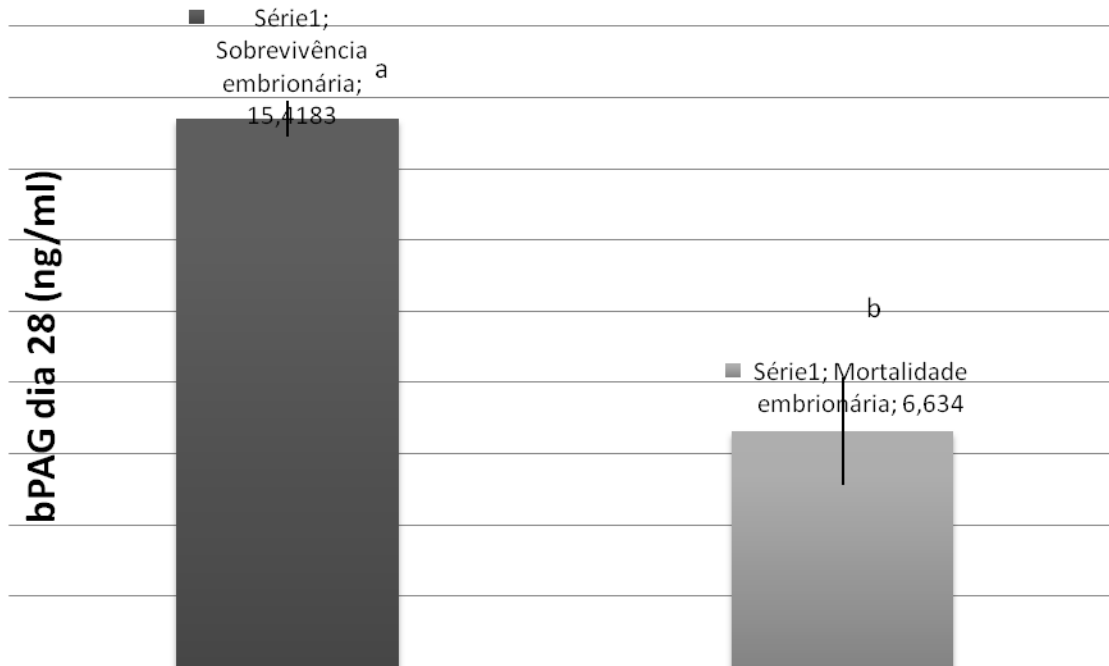


Figura 2. Concentrações séricas de bPAGs (média±EPM) no período pós-parto de vacas de corte Nelore que tinham recebido IATF no dia 0 e tinham um embrião viável no dia 28 da prenhez (n=803), e que no dia 100 tinham mantido o embrião (sobrevivência embrionária; n=714) ou passado por mortalidade embrionária (n=89). As vacas Nelore que sofreram mortalidade embrionária tardia até o dia 100 da prenhez tiveram concentrações circulantes de bPAGs menores ($P<0,05$) no dia 28, quando comparadas com as vacas que tinham mantido um embrião até o dia 100.

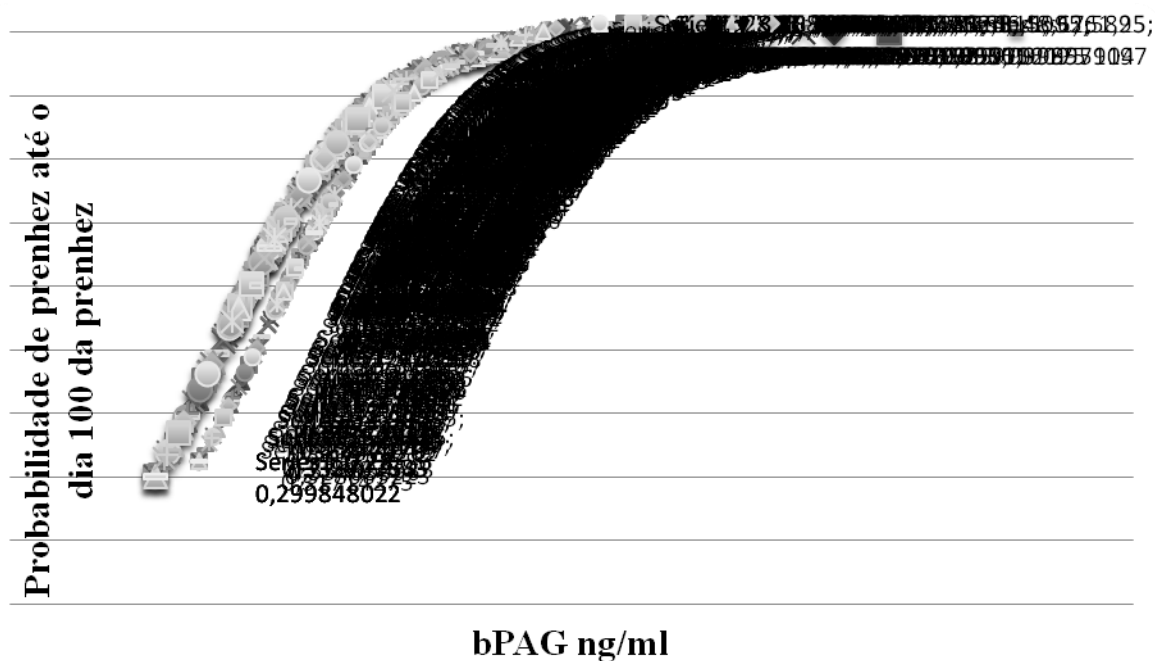


Figura 3. Probabilidade de manutenção da prenhez após IATF entre os dias 28 a 100 da prenhez, com base nas concentrações séricas de bPAGs (n=803) no dia 28. As concentrações séricas de bPAGs mais elevadas no dia 28 aumentaram significativamente ($P<0,05$) a probabilidade de manutenção da prenhez até o dia 100 em vacas de corte Nelore após IATF.

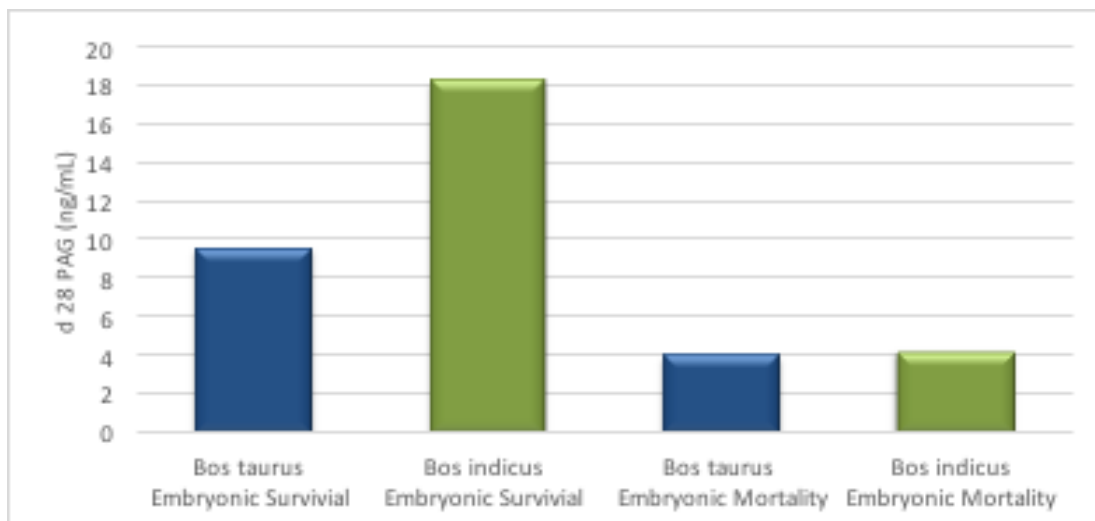


Figura 4. Concentrações séricas de PAGs em amostras coletadas no dia 28 da prenhez de vacas *Bos taurus* e vacas *Bos indicus* prenhes, diagnosticado com base no batimento cardíaco fetal. As vacas foram então divididas com base na manutenção da prenhez até o dia 72 (*Bos taurus*) ou dia 100 (*Bos indicus*) da prenhez (sobrevivência embrionária) ou mortalidade embrionária (entre dia 29-72 ou 100). Vacas de corte que tinham apresentado mortalidade embrionária tardia tinham concentrações circulantes de bPAGs menores ($P < 0,05$) no dia 28 quando comparadas com vacas que tinham mantido um embrião. Adaptado de Pohler, 2015 & Pohler.⁽¹¹⁾

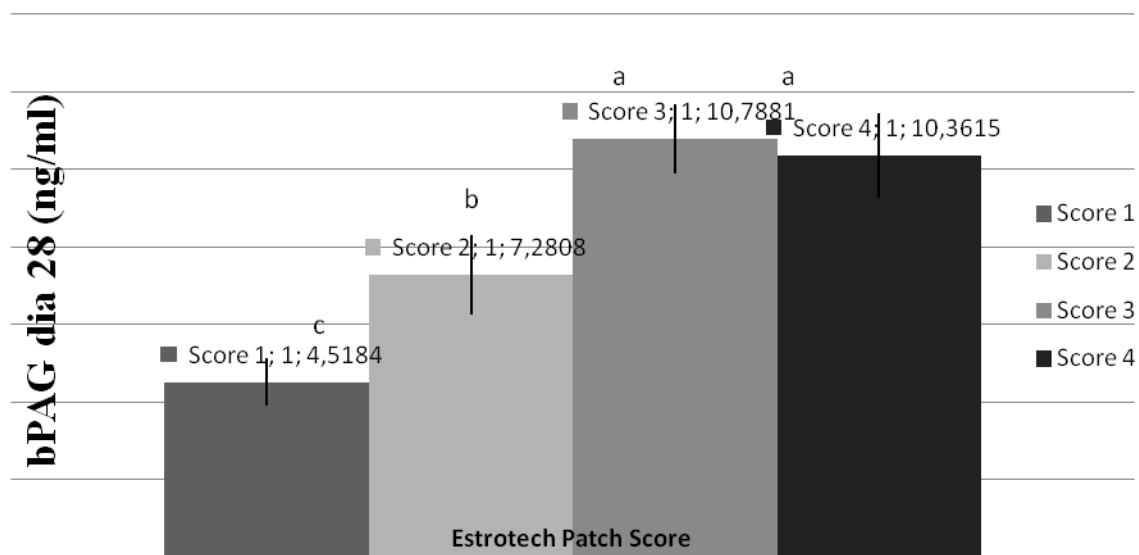


Figura 5. Concentrações séricas de glicoproteínas associadas à prenhez de vacas que tinham apresentado diferentes intensidades de estro. As vacas que exibiram estro com maior intensidade, de acordo com o adesivo Estrotech de detecção de estro, tiveram uma concentração maior de bPAG no dia 28.

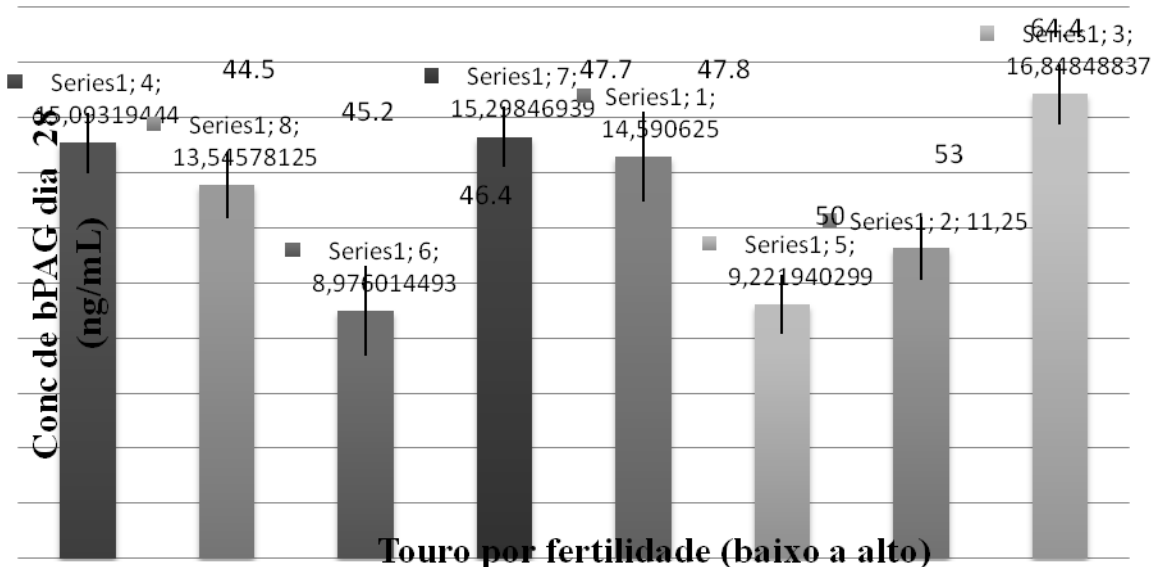


Figura 6: Concentrações séricas de bPAGs no dia 28 da prenhez em vacas emprenhadas pelos touros 1 a 8. Ainda que houvesse variação na taxa de prenhez com IATF entre os touros (44 a 64%), não houve uma relação linear entre a taxa de prenhez por touro e as concentrações circulantes de bPAGs. Houve, no entanto, diferenças significativas entre as concentrações circulantes de bPAGs entre os touros.

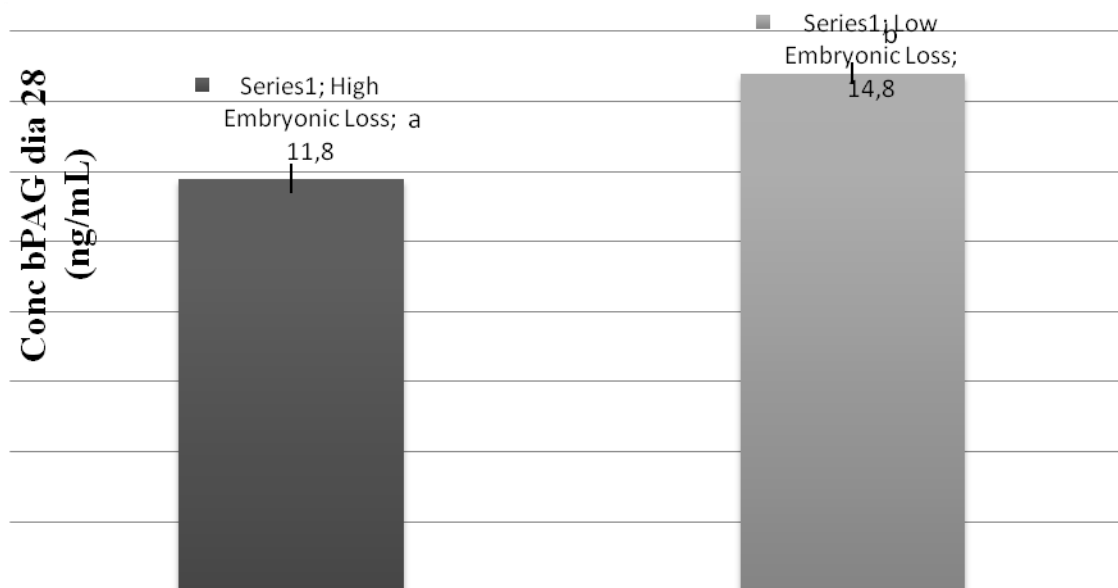


Figura 7. Concentrações séricas de bPAGs no dia 28 da prenhez entre touros que resultaram em elevada perda embrionária e touros que resultaram em baixa perda embrionária. Depois de retirar do conjunto de dados todas as vacas que perderam a prenhez depois do dia 28, os touros com a incidência mais elevada de mortalidade embrionária tardia eram também os touros com

XX Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos

prenhez que produziram concentrações circulantes maternas de bPAGs significativamente ($P < 0,05$) menores no dia 28 da prenhez, quando comparados com os demais touros que tiveram prenhez com menor mortalidade embrionária.

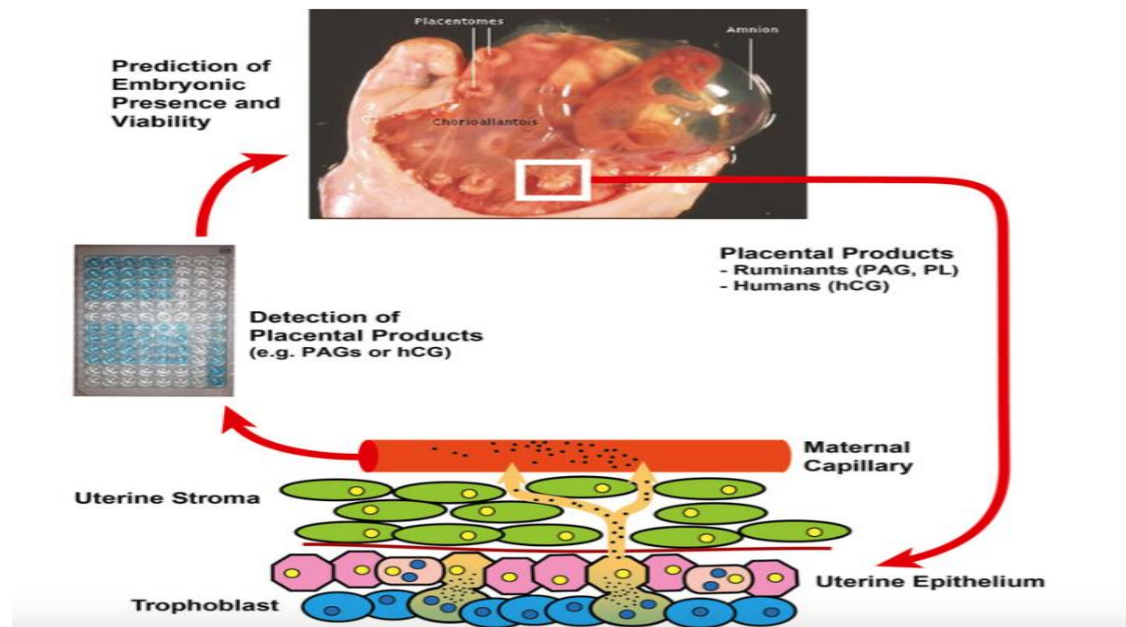


Figura 8: A figura mostra a produção de glicoproteínas associadas à prenhez (PAGs) e lactogênio placentário (PL) pelos trofoblastos binucleados (BNC) dentro de um placentoma da planta de ruminante. Os BNCs se fundem com as células epiteliais uterinas para formar as células trinucleadas e, posteriormente, PAGs e PL entram na circulação materna. A hipótese de trabalho é que os produtos placentários podem ser usados para monitorar a presença e o bem-estar do conceito. Figura adaptada de Pohler et al., 2015.

XX Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos

Referências bibliográficas

1. Santos R.M. & Vasconcelos J.L.M. 2010. Estratégias para reduzir perdas embrionárias. 1. <www.beefpoint.com.br> Acesso em 17 dez. 2015.
2. Dahlen C, Larson J, Lamb GC. Impacts of reproductive technologies on beef production in the United States. *Adv Exp Med Biol*. 2014;752:97-114. PubMed PMID: 24170356
3. Ferraz J.B.S., Eler J.P., Rezende. 2012. Impact of using artificial insemination on the multiplication of high genetic merit beef cattle in Brazil. *Anim Reprod* 2012; 9: 133-138
4. Seidel GE. Reproductive biotechnologies for profitable beef production. In *Proc Beef Improvement Federation* Sheridan, WY. 1995:27.
5. Patterson DJ, Mallory DA, Nash JM, et al. Strategies to optimize use of AI in cow/calf production systems: Focus on fixed-timed AI protocols for cows. *Proc Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle* Joplin, MO. 2011:43-77.
6. Wooding FB, Roberts RM, Green JA. Light and electron microscope immunocytochemical studies of the distribution of pregnancy associated glycoproteins (PAGs) throughout pregnancy in the cow: possible functional implications. *Placenta*. 2005 Nov;26(10):807-27. PubMed PMID: 16226131.
7. Sasser RG, Ruder CA, Ivani KA, et al. 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*. 1986 Nov;35(4):936-42. PubMed PMID: 3814705.
8. Green JA, Parks TE, Avelle MP, et al. The establishment of an ELISA for the detection of pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) in the serum of pregnant cows and heifers. *Theriogenology*. 2005 Mar 15;63(5):1481-503. PubMed PMID: 15725453.
9. Patel OV, Yamada O, Kizaki K, et al. Quantitative analysis throughout pregnancy of placental and interplacental expression of pregnancy-associated glycoproteins-1 and -9 in the cow. *Mol Reprod Dev*. 2004 Mar;67(3):257-63. PubMed PMID: 14735486.
10. Lobago F, Bekana M, Gustafsson H, et al. Serum profiles of pregnancy-associated glycoprotein, oestrone sulphate and progesterone during gestation and some factors influencing the profiles in Ethiopian Borana and crossbred cattle. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*. 2009 Aug;44(4):685-92. PubMed PMID: 19055565.
11. Sousa NM, Ayad A, Beckers JF, et al. Pregnancy-Associated Glycoproteins (Pag) as Pregnancy Markers in the Ruminants. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2006 Nov;57(Suppl 8):153-71. PubMed PMID: WOS:000208088300013. English.
12. Zoli AP, Guilbault LA, Delahaut P, et al. Radioimmunoassay of a bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum: its application for pregnancy diagnosis. *Biol Reprod*. 1992 Jan;46(1):83-92. PubMed PMID: 1547318.
13. Green JA, Xie S, Quan X, et al. Pregnancy-associated bovine and ovine glycoproteins exhibit spatially and temporally distinct expression patterns during pregnancy. *Biol Reprod*. 2000 Jun;62(6):1624-31. PubMed PMID: 10819764.
14. Pohler KG, Geary TW, Johnson CL, et al. Circulating bovine pregnancy associated glycoproteins are associated with late embryonic/fetal survival but not ovulatory follicle size in suckled beef cows. *J Anim Sci*. 2013 Sep;91(9):4158-67. PubMed PMID: 23825331. PMCID: 23825331.
15. Fricke PM, Giordano J, editors. Use of chemical tests for pregnancy diagnosis in a reproductive management program. *Proc Dairy Cattle Reprod Conf*, Kansas City, MO Dairy Cattle Reproduction Council, Hartland, WI; 2011.

16. Leblanc SJ. Short communication: field evaluation of a pregnancy confirmation test using milk samples in dairy cows. *J Dairy Sci.* 2013 Apr;96(4):2345-8. PubMed PMID: 23403192.
17. Ricci A, Carvalho PD, Amundson MC, et al. 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. *J Dairy Sci.* 2015 Apr;98(4):2502-14. PubMed PMID: 25660740.
18. Romano JE, Larson JE. Accuracy of pregnancy specific protein-B test for early pregnancy diagnosis in dairy cattle. *Theriogenology.* 2010 Oct 1;74(6):932-9. PubMed PMID: 20580072.
19. Silva E, Sterry RA, Kolb D, et al. 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.* 2007 Oct;90(10):4612-22. PubMed PMID: 17881682.
20. Thompson IM, Cerri RL, Kim IH, et al. Effects of resynchronization programs on pregnancy per artificial insemination, progesterone, and pregnancy-associated glycoproteins in plasma of lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 2010 Sep;93(9):4006-18. PubMed PMID: 20723675.
21. Diskin MG, Morris DG. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene.* 2008 Jul;43 Suppl 2:260-7. PubMed PMID: 18638133.
22. Diskin MG, Parr MH, Morris DG. Embryo death in cattle: an update. *Reprod Fertil Dev.* 2011;24(1):244-51. PubMed PMID: 22394965.
23. Perry GA, Smith MF, Lucy MC, et al. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Apr 5;102(14):5268-73. PubMed PMID: 15795381. PMCID: 556005.
24. Stevenson JS, Johnson SK, Medina-Britos MA, et al. Resynchronization of estrus in cattle of unknown pregnancy status using estrogen, progesterone, or both. *Journal of Animal Science.* 2003 Jul;81(7):1681-92. PubMed PMID: WOS:000186718100003. English.
25. Breukelman SP, Perenyi Z, Taverne MA, et al. Characterisation of pregnancy losses after embryo transfer by measuring plasma progesterone and bovine pregnancy-associated glycoprotein-1 concentrations. *Vet J.* 2012 Oct;194(1):71-6. PubMed PMID: 22516919.
26. Humblot F, Camous S, Martal J, et al. Pregnancy-specific protein B, progesterone concentrations and embryonic mortality during early pregnancy in dairy cows. *J Reprod Fertil.* 1988 May;83(1):215-23. PubMed PMID: 3397939.
27. Wallace JM, Aitken RP, Cheyne MA, et al. Pregnancy-specific protein B and progesterone concentrations in relation to nutritional regimen, placental mass and pregnancy outcome in growing adolescent ewes carrying singleton fetuses. *J Reprod Fertil.* 1997 Jan;109(1):53-8. PubMed PMID: 9068413.
28. Wallace RM, Pohler KG, Smith MF, et al. Placental PAGs: gene origins, expression patterns, and use as markers of pregnancy. *Reproduction.* 2015 Mar;149(3):R115-26. PubMed PMID: 25661256. PMCID: 25661256.
29. Pohler KG, Peres RFG, Green JA, et al. Use of bovine pregnancy associated glycoproteins (bPAGs) to diagnose pregnancy and predict late embryonic mortality in postpartum Nelore beef cows. *Theriogenology.* 2015. Submitted
30. Mercadante PM, Waters KM, Mercadante VR, Lamb GC, Elzo MA, Johnson SE, et al. Subspecies differences in early fetal development and plasma pregnancy-associated glycoprotein concentrations in cattle. *J Anim Sci.* 2013;91:3693-701.