PATRICIA ROTTA LOPES

**Avaliação de imunoensaio multianalito para dosagem de esteroides
sexuais em ruminantes**

São Paulo

2017

PATRICIA ROTTA LOPES

Avaliação de imunoensaio multianalito para dosagem de esteroides sexuais em ruminantes

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira

São Paulo

2017

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3489
FMVZ

Lopes, Patricia Rotta
Avaliação de imunoensaio multianálito para dosagem de esteroides sexuais em ruminantes. / Patricia Rotta Lopes. -- 2017.
83 f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira.

1. Progesterona. 2. Estradiol. 3. Ovinos. 4. Bovinos. 5. Bubalinos. I. Título.

Comissão de Ética no Uso de Animais

PARECER

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, *ad-referendum* da reunião de 15/3/2017, analisou o projeto protocolado sob o nº 3109/2013, intitulado: "Avaliação de imunoenensaio multianálito para dosagem de esteroides sexuais em ruminantes", utilizando 5 (cinco) ovinos, 5 (cinco) bovinos e 5 (cinco) bubalinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Claudio Alvarenga de Oliveira, e constatou que o protocolo apresentado não fere os princípios de ética adotados por esta Comissão.

São Paulo, 16 de fevereiro de 2017.

Denise Tabacchi Fantoni

Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: LOPES, Patricia Rotta

Título: Avaliação de imunoensaio multianalito para dosagem de esteroides sexuais em ruminantes

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: __/__/__

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof.Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof.Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof.Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof.Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

*A todos que contribuíram para a realização deste
trabalho*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Assim como uma andorinha só não faz verão, uma doutoranda só não faz uma tese. Foram necessárias muita ajuda, suporte, dedicação e colaboração de diversas pessoas para que este trabalho pudesse ser realizado. Por este motivo, eu agradeço infinitamente à todas as pessoas que participaram direta ou indiretamente e que tornaram este trabalho possível.

Foram muitas pessoas: minha família; professores (especialmente Profa. Camila e Profa. Mayra); pós-graduandos (especialmente Fernanda Regazzi, Cristina Lucio, Julia Baldrighi, Raquel Fukumori); residentes de ruminantes do Hovet; estagiários (Ana, Bia); pesquisadores (Nelcio); técnicos (Ivanir), secretárias (Harumi, Roberta), funcionários, minha banca de qualificação (Lili e Profa, Carla), colegas... e os animais. Todos fundamentais. Todos especiais. Todos importantes. É impossível citar todos os nomes, sou sabotada por minha frágil memória. Eu agradeço à TODOS que de alguma forma participaram e são à esses TODOS que eu dedico esta tese.

Em especial agradeço ao meu orientador **Prof. Dr. Claudio Alvarenga de Oliveira** e à **Dra. Priscila Viau Furtado**. “Pai” e “Mãe” deste trabalho.

E à **FAPESP**, pelo auxílio financeiro.

“A educação é a descoberta progressiva da nossa ignorância”

(Will Durant)

“Querem que vos ensine o modo de chegar à ciência verdadeira? Aquilo que se sabe, saber que se sabe; aquilo que não se sabe, saber que não se sabe; na verdade é este o saber”

(Confúcio)

RESUMO

LOPES, P. R. **Avaliação de imunoensaio multianalito para dosagem de esteroides sexuais em ruminantes**. Evaluation of multi-analyte immunoassay technique to quantify sexual steroids in ruminants]. 2017. 83 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

As dosagens de estradiol e progesterona são utilizadas em grande número de pesquisas em reprodução animal. Vários métodos e anticorpos para quantificação vêm sendo desenvolvidos, porém cada metodologia analítica possui vantagens e limitações. O radioimunoensaio é o mais utilizado, mas tem como principal desvantagem o envolvimento de material radioativo. A preocupação neste setor aliada às exigências das legislações em questões ambientais, têm aumentado a necessidade do desenvolvimento de novas técnicas sem a utilização de material radioativo. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a técnica xMAP-Multiplex® para dosagem de estradiol e progesterona em vacas, ovelhas e búfalas. Foram utilizados cinco animais de cada espécie. O ciclo estral dos animais foi sincronizado com a utilização de prostaglandina e amostras sanguíneas foram coletadas durante o ciclo estral. As concentrações séricas de progesterona e estradiol dos animais do estudo foram obtidas pelo MILLIPLEX® MAP *Multi Species Steroid kit* (STTHMAG-21K; Millipore, Billerica, MA). Nas condições em que este experimento foi realizado, os resultados mostraram que esta técnica é viável para a avaliação do perfil progesterônico destas espécies, mas não para avaliar o perfil estrogênico.

Palavras-chave: Progesterona. Estradiol. Ovinos. Bovinos. Bubalinos.

ABSTRACT

LOPES, P. R. **Evaluation of multi-analyte immunoassay technique to quantify sexual steroids in ruminants.** [Avaliação de imunoensaio multianalito para dosagem de esteroides sexuais em ruminantes]. 2017. 83 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Quantification of estradiol and progesterone are used in a big number of animal's reproduction's researches. Several methods and antibodies to quantify them have been developed, but each analytical methodology has advantages and limitations. Radioimmunoassay is the most widely used method, but it has as major disadvantage the use of radioactive material. The concerns at this area added to the requirements of legislations about environmental topics have increased the need to development techniques without the use of radioactive material. The aim of this research was to evaluate the xMAP-Multiplex® technique to quantify progesterone and estradiol in ovines, bovines and bubalins. Five animals of each species were used. The estrous cycle of the animals was synchronized by prostaglandin and blood samples were collected during the estrous cycle. The seric concentrations of progesterone and estradiol were obtained by MILLIPLEX® MAP *Multi Species Steroid kit* (STTHMAG-21K; Millipore, Billerica, MA). Under the conditios of this experiment the results showed that this technique is practicable to evaluate progesterone's profile in those animals, but not to evaluate their estradiol's profile.

Keywords: Progesterone. Estradiol. Ovines. Bovines. Bubalins.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1.1 Vacas	15
2.1.2 Ovelhas	17
2.1.3 Búfalas	20
2.2. DOSAGEM DE ESTEROIDES SEXUAIS EM REPRODUÇÃO ANIMAL	22
2.2.1 Hormônios esteroides	22
2.2.2. Uso da dosagem de progesterona e estradiol no estudo da reprodução de animais domésticos	23
2.3. METODOLOGIAS IMUNOANALÍTICAS	24
2.3.1 Radioimunoensaio (RIE)	25
2.3.2 Enzimaimunoensaio (EIE)	28
2.3.3 Quimioluminescência	29
2.3.4 Tecnologia xMAP-Multiplex®	30
2.4 VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO	31
3 HIPÓTESE	33
4 OBJETIVOS	35
5 MATERIAL E MÉTODOS	37
5.1 ANIMAIS E LOCAL DO EXPERIMENTO	37
5.1.1 Ovelhas	37
5.1.2 Vacas	38
5.1.3 Búfalas	38
5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	38
5.2.1 Ovelhas	38
5.2.2 Vacas	39
5.2.3 Búfalas	39
5.3 COLETA DE SANGUE E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS	39
5.4 DOSAGENS HORMONAIS	40
5.4.1 Milliplex®	40

5.4.2 Radioimunoensaio.....	42
5.5 ANÁLISES DOS RESULTADOS.....	43
6 RESULTADOS.....	45
6.1 PARÂMETROS DE QUALIDADE DOS ENSAIOS HORMONAIS.....	45
6.2 MILLIPLEX®.....	47
6.2.1 Ovelhas.....	47
6.2.2 Vacas.....	52
6.2.3 Búfalas.....	58
6.2 RIE.....	62
7 DISCUSSÃO.....	66
7.1 OVELHAS.....	66
7.2 VACAS.....	67
7.1 BÚFALAS.....	68
8 CONCLUSÃO.....	70
REFERÊNCIAS.....	72

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As dosagens dos esteroides reprodutivos estradiol e progesterona são amplamente empregadas em diversas pesquisas na área de reprodução animal, e são de grande necessidade para a compreensão do ciclo estral e características reprodutivas das diferentes espécies de animais e também para a avaliação do emprego de biotécnicas reprodutivas, como mostram diversos trabalhos que vêm sendo realizados há vários anos em bovinos (BADINGA et al., 1992; KNICKERBOCKER et al., 1986; ROTH et al., 2012; SANTIAGO et al., 2001), bubalinos (ABDULKAREEM et al., 2012; AVENELL; SAEPUDIN; FLETCHER, 1985; BARUSELLI, 2001; KAMBOJ; PRAKASH, 1993) e ovinos (ALECOZAY et al., 1988; BARRET et al., 2004; BARTLEWISKI et al., 1999; REDMOND et al., 2011; SEEKALLU et al., 2010), além de outras espécies de animais domésticos, como caprinos (SIQUEIRA et al., 2012), suínos (NUNES et al., 2003), caninos (ALAÇAM; AY; SABAN, 2009; ROTA et al., 2007; SOUZA, 2015) e equinos (ALMEIDA et al., 2001).

A eficiência reprodutiva é fator indispensável dentro de um rebanho para aumentar a produtividade e rentabilidade e, dentro deste contexto, eleva-se a demanda por pesquisas na área das biotécnicas reprodutivas, sendo a caracterização das diferentes fases do ciclo estral condição básica para a aplicação das biotécnicas. Compreender os fenômenos fisiológicos associados ao crescimento folicular e à ovulação é de extrema importância para aprimorar as biotecnologias reprodutivas e, por consequência, a eficiência reprodutiva (BARUSELLI, GIMENES; SALES; 2007; LIMA, 2012; SIMPLÍCIO; FREITAS; FONSECA, 2007).

É indiscutível que, ao longo dos últimos anos, as ferramentas para análise das concentrações hormonais utilizadas por laboratórios para avaliação das funções hormonais vêm sofrendo modificações extremamente importantes e significativas. Entre as principais desvantagens encontradas nos métodos convencionais de imunoanálise estão a significativa complexidade associada à sua automação e longo tempo de análise. As metodologias utilizadas têm sido avaliadas e adequadas de acordo com o avanço tecnológico, com o surgimento de testes cada vez mais sensíveis e específicos, melhorando a precisão dos resultados. Cada vez mais, a técnica-padrão do radioimunoensaio (RIE) vem sendo substituída por metodologias

sem o uso de marcadores radioativos, como enzimaímmunoensaio (EIE), quimioluminescência (QUIMIO) e espectrometria de massa. Diversas técnicas vêm sendo desenvolvidas para dosar analitos solúveis em diferentes fluidos biológicos, porém cada técnica possui uma ou mais limitações significativas (FERNANDES et al., 2011; FURTADO, 2007; GIL; KUBOTA; YAMAMOTO, 1999; VIGNALI, 2000).

As tendências da utilização de imunoensaios já no final do século passado apontavam para o desenvolvimento de ensaios mais rápidos, para a utilização de sistemas de detecção não radioativos, como imunossensores, e para o desenvolvimento de métodos para análise de multianalitos (GIL; KUMOTA; YAMAOMOTO, 1999).

Enquanto o enzimaímmunoensaio quantifica apenas um analito por vez, uma técnica criada há pouco mais de uma década, a tecnologia xMAP-Multiplex®, que utiliza microesferas como suporte sólido para o imunoensaio, surgiu com o objetivo de superar esta limitação. Esta tecnologia apresenta as seguintes vantagens: ausência de risco de radiação; detecção simultânea de analito; necessidade de pequena quantidade de amostra (5 a 50 µL) e menor custo por amostra dosada (VIGNALI, 2000).

Há trabalhos que utilizaram a tecnologia xMAP-Multiplex® em estudos com reprodução animal (GOPICHANDRAN et al., 2006; KARLSSON et al., 2012; SOUZA, 2015), porém ainda não foi avaliada sua aplicabilidade para dosagem de esteroides sexuais em ruminantes.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura foi redigida em quatro tópicos, compreendendo: 1 – ciclo estral; 2 – dosagem de esteroides sexuais em reprodução animal; 3 – metodologias imunoanalíticas; 4 – validação do método.

2.1 CICLO ESTRAL

2.1.1 Vacas

As vacas são animais poliétricos cujo ciclo estral apresenta duração média de 21 dias (18 a 24 dias). O ciclo consiste de uma fase folicular (4 a 6 dias), que compreende proestro e estro e de uma fase lútea (14 a 18 dias), que compreende metaestro e diestro. A regulação do ciclo estral é feita por hormônios hipotalâmicos, como o GnRh (hormônio liberador de gonadotrofina); hormônios hipofisários, como o FSH (hormônio folículo estimulante) e o LH (hormônio luteinizante); hormônios ovarianos, como P4 (progesterona), E2 (estradiol) e inibina; e útero (prostaglandinas) (FORDE et al., 2011) (Figura 1).

Durante o ciclo há geralmente duas (vacas leiteiras) ou três (novilhas e vacas de corte) ondas de crescimento folicular (FORDE et al., 2011). Em novilhas podem haver até quatro ondas (SANTIAGO et al., 2001). Cada onda consiste de um período de emergência de um grupo de folículos, de seleção de um folículo dominante e de atresia ou ovulação do folículo dominante (SENGER, 2005). Cada onda de crescimento folicular é precedida por uma elevação transitória nas concentrações de FSH (FORDE et al., 2011)

Figura 1 – Representação esquemática do padrão de secreção do FSH, LH e progesterona e o padrão de crescimento dos folículos ovarianos na espécie bovina (Fonte: Forde et al., 2011)

O proestro tem início com a regressão estrutural e funcional do corpo lúteo e, consequentemente, diminuição na concentração de progesterona, e é caracterizado pelo aumento da síntese de estrógenos pelos folículos pré-ovulatórios (SENGER, 2005). No estro, os níveis de estradiol alcançam os valores máximos médios de 7,9 pg/mL em vacas lactantes e 16,7 pg/mL em vacas não lactantes (AYRES, 2011; SARTORI et al., 2004). Na ausência de progesterona, as elevadas concentrações de estradiol determinam o fim do proestro e o início do estro, induzindo o comportamento de cio (SENGER, 2005).

Vacas zebuínas geralmente apresentam estro de duração mais curta, com média de 12,9 horas, do que as taurinas, com média 16,3 horas (BARUSELI, GIMENES; SALES; 2007). Martins et al. (2008) mostraram que o pico de estradiol sérico pré-ovulatório é menor em vacas zebuínas com alta ingestão alimentar. Wolfenson et al. (2004) reportam que a concentração de estradiol no estro é maior em novilhas do que em vacas (20 versus 9 pg/mL).

O estro se estende até a ovulação do folículo dominante. O início da fase lútea é chamado de metaestro e geralmente tem duração de 3 a 4 dias e é caracterizado pela formação do corpo lúteo a partir do corpo hemorrágico, formado após a ovulação do folículo dominante (FORDE et al., 2011). A fase lútea do ciclo se caracteriza pela presença do corpo lúteo funcional, que sintetiza progesterona

(SENGER, 2005). Durante o diestro, a concentração de progesterona aumenta rapidamente a partir do 4º dia (1,5 ng/mL) até o 8º dia (5,5 ng/mL). A partir deste ponto, o aumento nas concentrações de progesterona ocorre mais lentamente e atinge seu valor máximo no dia 16 do ciclo estral (ao redor de 7 ng/mL) (AYRES, 2011).

Os corpos lúteos de animais zebuínos são menores em tamanho e em quantidade de progesterona por grama de tecido lúteo comparado a corpos lúteos de animais taurinos, o que pode refletir na diminuição das concentrações de progesterona circulante em animais zebuínos (LIMA et al., 2007).

Santiago et al. (2001) mostraram que os valores médios da concentração de progesterona plasmática durante o ciclo estral de novilhas Nelore são diferentes dependendo do número de ondas de crescimento folicular que o animal possui. Nos animais com ciclos de aproximadamente 21 dias (duas ou três ondas), o valor obtido na concentração de progesterona foi de 2,54 ng/mL. Já nos animais com ciclos mais longos, superior a 25 dias (quatro ondas), o valor foi de 4,27 ng/mL.

De acordo com Wiltbank et al. (2006), vacas de alta produção leiteira ovulam folículos maiores, mas possuem menor concentração de estradiol circulante. Possuem também maior volume de tecido lúteo e menor concentração de progesterona circulante, sendo seu valor máximo médio de 5,6 ng/mL.

2.1.2 Ovelhas

A espécie ovina é poliéstrica sazonal. A maioria das raças de ovinos apresenta um modelo de reprodução sazonal com incidência de ciclos estrais concentrada durante o outono e o inverno. O fotoperíodo é um dos principais fatores responsáveis por essa estacionalidade, sendo que sua influência na reprodução tem como interdependência a latitude em caráter diretamente proporcional, ou seja, quanto mais elevada é a latitude, maior é a variação da intensidade luminosa e maior é a relação da estacionalidade reprodutiva com o fotoperíodo. No Estado de São Paulo, porém, as fêmeas da raça Santo Inês quase não respondem à variação anual fotoperiódica (LOUREIRO, 2003; SASA et al., 2002).

O fotoperíodo influencia a atividade da glândula pineal que é mediada pela melatonina. Este hormônio é produzido em um ritmo diário, com os valores mais

altos ocorrendo durante a noite e sua função endócrina está intimamente ligada ao sistema reprodutivo. A melatonina é sintetizada a partir do triptofano, um aminoácido essencial obtido através da dieta (LOUREIRO, 2003).

A duração média do ciclo estral na ovelha é de 17 ± 2 dias. Considerando o estro como o dia 0, a fase progesterônica ocorre entre os dias 2 e 13 e é caracterizada pelo metaestro e o diestro; e a fase estrogênica ocorre entre os dias 14 e 1 e é caracterizada pelo proestro e estro. No proestro ocorre crescimento folicular e secreção de estrógenos, sob estímulo de gonadotrofinas hipofisárias. As concentrações de estrógeno aumentam progressivamente no sangue, e estão associadas com alterações nos órgãos reprodutivos, como aumento no suprimento sanguíneo no trato genital. Com a aproximação do estro, a vulva incha, a mucosa torna-se hiperêmico e as glândulas da cérvix e vagina produzem secreção serosa que aparece como uma descarga vaginal. O estro varia de 20 a 36 horas, com média de 26 horas. O comprimento da fase lútea determina o comprimento do ciclo. A ovulação é espontânea e ocorre de 21 a 33 horas após o início do estro (DIAS, 2011; SASA et al., 2002).

A progesterona é o maior controlador da secreção tônica de hormônio luteinizante (LH), com sua ação mais amplamente exercida em união com outros esteroides ovarianos, como o estrógeno, inibindo o eixo reprodutivo neuroendócrino. O estro não ocorre se a progesterona apresentar níveis altos, ou maiores que 1 ng/mL (SOUZA et al., 2008).

O crescimento dos folículos antrais ocorre em padrão de ondas. Há de 3 a 4 emergências de ondas foliculares durante o intervalo inter-ovulatório. Os maiores folículos adquirem a capacidade de secretar estradiol e o pico da secreção ocorre quando eles alcançam os maiores diâmetros. Em algumas raças podem ocorrer ovulação de folículos provenientes das duas últimas ondas de crescimento folicular (BARTLEWISKI et al., 1999; BARTLEWISKI; BABY; GIFFIN; 2011).

Durante o ciclo estral há de 3 a 4 aumentos significativos na concentração de estradiol. O primeiro aumento ocorre no dia seguinte ao início da luteólise e concomitantemente com o aumento na frequência pulsátil de LH. No momento do pico pré-ovulatório de LH, as concentrações de progesterona aumentam no fluido folicular enquanto as do estradiol diminuem a valores mínimos dentro de 16 a 24 horas do surgimento do pico. Durante a fase lútea ocorrem subseqüentes aumentos

na secreção de estradiol em intervalos de 3 a 4 dias (BARTLEWISKI; BABY; GIFFIN; 2011).

A concentração de progesterona durante o anestro e o estro é < 1 ng/mL e continua baixa imediatamente após a ovulação (D0) e durante o período de formação do corpo lúteo. Posteriormente, entre os dias 3 e 7 do ciclo, há aumento em sua concentração, que permanece constante até por volta do dia 12. Os valores encontrados por Alecozay et al. (1988) foram de 4,2 a 14 ng/mL, e média de 7 ng/mL. Após este momento, a concentração deste hormônio sofre rápido declínio (BARTLEWISKI; BABY; GIFFIN; 2011). Furtado (2007) relata concentração média de progesterona de 0,55 ng/mL na fase não lútea e de 5,48 ng/mL na fase lútea. Dias et al. (2015) reportam concentrações progesterônicas médias de 0,5 (D0), 5,55 (D5), 7,33 (D9) e 6,96 (D11), sendo D1 considerado o primeiro dia em que os valores de progesterona apresentarem-se maiores que 1 ng/mL (Figura 2).

Figura 2 – Concentrações médias de progesterona em 12 ovelhas Santo Inês do dia 0 (D0) ao dia 11 (D11) do ciclo estral, sendo D1 considerado o primeiro dia em que os valores de progesterona apresentarem-se maiores que 1 ng/mL (Fonte: DIAS, 2015)

2.1.3 Búfalas

Os bubalinos são animais poliéstricos estacionais de dias curtos, semelhantemente ao que ocorre em ovinos e caprinos, apresentam aumento da atividade reprodutiva nos meses de outono e inverno. Da mesma forma que ocorre em outras espécies, o hormônio responsável por sinalizar a alternância claro/escuro em búfalos é a melatonina, que controla o início ou o término da atividade cíclica nesta espécie (FILHO, 2004).

A duração do ciclo estral em búfalas é de 17 a 26 dias, com média de 21 dias. Há, porém, uma maior variação na duração dos ciclos estrais desta espécie quando comparada aos bovinos. As búfalas apresentam uma maior incidência de ciclos anormais, tanto curtos como longos. Isto pode ocorrer por diversos fatores, incluindo condições ambientais adversas, nutrição e irregularidades na secreção de hormônios esteroides ovarianos (WARRIACH et al., 2015).

A dinâmica folicular durante o ciclo estral de búfalas é muito semelhante à de vacas. O desenvolvimento folicular ocorre em ondas, de uma a três, sendo mais comum o padrão de duas ondas de desenvolvimento folicular. A primeira onda tem início no terceiro dia do ciclo estral e se encerra no décimo terceiro dia. A segunda onda se inicia no nono dia e promove a ovulação do folículo dominante (BARUSELLI et al., 1997; WARRIACH et al., 2015).

O estudo da foliculogênese é de grande importância em bubalinos, pois esta espécie possui capacidade reprodutiva inferior à dos bovinos, com folículos ovarianos em menor quantidade e qualidade, e limitada resposta à superovulação. A baixa eficiência reprodutiva em búfalas está relacionada com a sua produtividade. Dentre os fatores relacionados a este desempenho reprodutivo estão: maturidade tardia inerente, pobre expressão de cio no verão, padrão reprodutivo sazonal e intervalo entre partos prolongado. A duração do estro varia de 6 a 48 horas. Foi observada duração média de 14,7 horas com a ovulação ocorrendo 16,9 horas após o final do estro. O comportamento de estro, portanto, é muito variável, o que torna difícil prever o momento exato da ovulação e dificulta o uso da inseminação artificial (FERRAZ, 2008).

Segundo Perera (2011), as alterações nas concentrações de estradiol e progesterona durante o ciclo estral de búfalas são semelhantes as encontradas em bovinos (Figura 3). Warriach et al. (2015) entretanto relatam que estudos sobre

comportamento sexual e endocrinologia reprodutiva em bubalinos mostraram uma variação significativa na atividade endócrina reprodutiva nesta espécie, incluindo ciclos silenciosos. Os autores atribuem estes estros de baixa intensidade possivelmente à baixas concentrações circulantes de 17β -estradiol nesta espécie.

Figura 3 – Representação gráfica esquemática das alterações hormonais séricas que acontecem durante o ciclo estral em búfalas (Fonte: PERERA, 2011)

2.2. DOSAGEM DE ESTEROIDES SEXUAIS EM REPRODUÇÃO ANIMAL

2.2.1 Hormônios esteroides

Os hormônios esteroides possuem uma estrutura formada por um anel hidrofóbico tetracíclico de peridro-1,2-ciclopentanofenantreno em sua estrutura. São classificados em seis grupos de acordo com o número de átomos de carbono: C₁₇ *Gonanas*; C₁₈ *Oestranas* (como o estradiol e estrona); C₁₉ *Androstanas* (como a testosterona); C₂₁ *Pregnanas* (como a progesterona e o cortisol); C₂₄ *Cholanas* (como os ácidos biliares) e C₂₇ *Cholestanas* (como o colesterol). Também são classificados frequentemente por sua atividade biológica em: andrógenos; estrógenos; progestágenos; corticosteroides; mineralocorticoides; vitamina D; e ácidos biliares (SILVA, 2007).

O colesterol é o hormônio esteroide de maior prevalência no organismo e o precursor dos estrógenos e progestinas, principais hormônios esteroides sexuais femininos. Os principais estrógenos são o estradiol, a estrona e o estriol. O 17 β -estradiol é produzido pelas células da teca e da granulosa do folículo ovariano. A progesterona, principal progestágeno, é produzida principalmente por corpos lúteos e placenta, mas também pelo córtex adrenal e testículos (LITWACK; SCHMIDT, 1998; NORMAN; LITWACK, 1997; SILVA, 2007).

Os hormônios esteroides não são hidrossolúveis e, por tanto, precisam estar ligados a moléculas hidrossolúveis para serem transportados no plasma. Os esteroides se ligam a uma variedade de proteínas plasmáticas. A ligação desses hormônios à estas proteínas tende a aumentar sua meia-vida. Quando a proteína carreadora entra em contato com a célula alvo, o hormônio se dissocia da proteína e se difunde pela membrana plasmática, por ser lipossolúvel. Posteriormente o hormônio se liga ao seu receptor nuclear e inicia-se um processo de transcrição. O recém-sintetizado RNA (*ribonucleic acid*) mensageiro deixa o núcleo e se liga a ribossomos, onde irá direcionar a síntese de proteínas (SENGER, 2005).

A metabolização dos esteroides ocorre no fígado, que os inativam e, posteriormente, são excretados pela urina e pelas fezes (SENGER, 2005).

2.2.2. Uso da dosagem de progesterona e estradiol no estudo da reprodução de animais domésticos

Em reprodução bovina, as dosagens de estradiol e progesterona são empregadas em diversas linhas de pesquisa, como, por exemplo, no estudo da fisiologia reprodutiva (SARTORI et al., 2004; SHAHAM-ALBALANCY et al., 2001; SHRESTHA et al., 2010; WOLFENSON et al., 2004); patologia reprodutiva (WISCHRAL et al., 2001); efeitos da nutrição sobre a reprodução em novilhas (CORAH et al., 1974; RIGOLON et al., 2008) e vacas taurinas e zebuínas (MARTINS et al., 2008; SALLES, 2010; SANGSRITAVONG et al., 2002); na manipulação e controle do ciclo estral (RATHBONE et al., 2001); no estudo dos efeitos das biotécnicas de reprodução assistida desenvolvida nas últimas décadas, como a aspiração folicular guiada por ultrassom para produção in vitro de embriões (STUBBINGS; WALTON, 1995).

O estudo da manipulação e controle reprodutivo em bovinos é importante para avaliar o uso de tratamentos hormonais no aumento da performance reprodutiva de vacas em anestro (BARUSELLI et al., 2004); para estudar diferentes protocolos de sincronização de estro (LIMA et al., 2007) e ovulação para IATF (inseminação artificial em tempo fixo) (CARVALHO, 2004) e protocolos de superovulação para TE (transferência de embrião) (KAFI; MCGOWAN, 1997; KANUYA et al., 1997) e comparar taxas de fertilidade com o uso de diferentes dispositivos intravaginais de progesterona (WERVEN et al., 2013), entre outros.

Em ovinos, as dosagens de esteroides sexuais são empregadas, por exemplo, no estudo da fisiologia reprodutiva (RUBIANES; UNGERFELD; 1993); para avaliar a influência da latitude na estacionalidade reprodutiva (SOUZA et al., 2008); os efeitos do estresse térmico e nutricional e enfermidades no ciclo estral (HADEF; MIROUD, KAIDI, 2014; SEJIAN; MAURYA; NAQVI, 2011); a eficiência de diferentes protocolos de sincronização de estro e indução de estro e da ovulação (BARRET et al., 2004; BARRET et al., 2008; DIAS, 2011; DIAS et al., 2015; LETELIER et al., 2009; LEYVA; BUCKRELL; WALTON, 1998) como, por exemplo, uso de dispositivos intravaginais de progesterona (PINNA et al., 2012), aplicação de progestágenos, prostaglandinas, gonadotrofina coriônica equina (SANTOS; BARCELOS, 2012), implantes de melatonina (LOUREIRO, 2003); no estudo da dinâmica folicular

(BARTLEWSKI et al., 1999) e da resposta superovulatória (BARTLEWSKI; ALEXANDER; KING, 2008; RUBIANES et al., 1996).

Em bubalinos, pesquisas envolvendo dosagens de esteroides reprodutivos foram realizadas para estudar a fisiologia de aspectos reprodutivos da espécie (ABDULKAREEM et al.; 2012); dinâmica folicular (BARUSELLI et al., 1997); protocolos de sincronização da ovulação (BARUSELLI, 2001; FILHO 2004), entre outros.

Dosagem dos esteroides sexuais progesterona e estradiol também é utilizada no estudo da reprodução de outras espécies domésticas, como caninos (ROTA et al., 2007), caprinos (SIQUEIRA et al., 2012) e equinos (ALMEIDA et al., 2001), entre outras.

2.3. METODOLOGIAS IMUNOANALÍTICAS

A análise de esteroides geralmente é realizada por meio de dois tipos de métodos: os imunoensaios, como o radioimunoensaio (RIE) e o enzimaensaio (EIE); e os físico-químicos, como os métodos cromatográficos. Entre os métodos cromatográficos encontram-se a cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, cromatografia em camada delgada de alta eficiência e eletroforese capilar (SILVA, 2007).

Uma das primeiras técnicas imunoanalíticas relatadas foi a imunoprecipitação, uma técnica semi-quantitativa usada até hoje em testes positivo/negativos. Um fator marcante em imunoanálises é o ganho em seletividade, devido à alta especificidade de anticorpos por seus antígenos. Além da seletividade, os imunoensaios apresentam também, dependendo do marcador ou sistema de detecção a ser empregado, boa sensibilidade (GIL; KUBOTA; YAMAMOTO, 1999).

Os imunoensaios baseiam-se na reação antígeno-anticorpo e posterior revelação desta reação, de forma a qualificar/quantificar o ensaio. A revelação pode ser, por exemplo, por reação enzimática (enzimaensaio) ou por emissão de radioatividade por meio de um isótopo marcado (radioimunoensaio). Em ambos os casos, é necessário que se produza o anticorpo contra a molécula que se deseja identificar ou detectar (SILVA, 2007).

O radioimunoensaio constitui-se em grande avanço no campo dos imunoensaios quantitativos, seguido pelo surgimento do enzima imunoensaio (GIL; KUBOTA; YAMAMOTO 1999). Apesar de ser o método mais sensível e usado rotineiramente nos laboratórios, o RIE somente permite a determinação de um esteroide a cada análise, aumentando o custo e o tempo da análise. Apresenta ainda a desvantagem de gerar material radioativo; a possibilidade de reações cruzadas, mascarando os resultados; dificuldade de se obter anticorpos de especificidade absoluta, devido à grande semelhança estrutural que existe entre os hormônios. O EIE, por sua vez, não tem em geral a mesma sensibilidade que o RIE (LIMA, 2012; SILVA, 2007).

2.3.1 Radioimunoensaio (RIE)

Esta tecnologia tem revolucionado o entendimento da fisiologia endócrina em quase todas as espécies animais nos últimos anos. A dosagem rotineira de hormônios esteroides no soro teve início com o trabalho pioneiro de Abraham (1969), que descreveu o primeiro radioimunoensaio de um esteroide hormonal, o estradiol (FURTADO, 2007; SENGGER, 2005; SILVA, 2007).

A técnica de radioimunoensaio se baseia no uso de um agente ligante específico e de hormônios radioativos como traçadores, para medir a concentração hormonal. Segundo os princípios desse método, uma quantidade fixa de hormônio radioativo compete com o mesmo hormônio a ser dosado, que não é radioativo, por um número limitado de sítios de ligação de um agente ligante de alta afinidade e especificidade pelo hormônio em questão. A quantidade do hormônio radioativo que se liga é inversamente proporcional a concentração do hormônio não radioativo a ser dosado. Esta tecnologia exige laboratórios aprovados para manipulação de radioisótopos e equipamentos dispendiosos para a detecção da radioatividade (FURTADO, 2007; HAFEZ, 1995; SENGGER, 2005; THOREL; LARSON, 1978).

As vantagens em se dosar por RIE são a alta sensibilidade para detectar antígenos em concentrações muito pequenas, picomolares. A maioria dos conjuntos diagnósticos comerciais (*kits*) disponíveis no mercado foi desenvolvida para a avaliação quantitativa de hormônios no soro humano, sendo necessária a validação

destes *kits* para uso na veterinária, assim como qualquer outro imunoensaio que utilize anticorpos desenvolvidos para dosagem na espécie humana (FURTADO, 2007).

Como o RIE utiliza radioisótopo, é necessário, no Brasil, que o laboratório tenha licença especial da Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), que é o órgão regulador. São também necessárias instalações adequadas para sua manipulação e descarte, ocasionando ainda problemas de armazenamento e, principalmente, perigo de exposição à radiação. Sendo assim, esta metodologia tem custo elevado por amostra dosada. No entanto, ainda é amplamente preconizado seu uso na veterinária, por ser um sistema aberto de dosagem, tornando-se fácil sua validação, e os resultados gerados são de alta confiabilidade (FURTADO, 2007).

Encontram-se na literatura diversos trabalhos de pesquisa na área de reprodução animal utilizando a tecnologia do RIE para quantificar progesterona e estradiol em diferentes espécies.

Com relação a dosagem de progesterona sérica em bovinos, podemos citar RIE em fase sólida com uso do *kit* comercial “Coat-A-Count, Siemens Healthcare Diagnostics, Los Angeles, CA, USA”, antigo “Coat-A-Count, DPC, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA” (AYRES, 2011; CARVALHO, 2004; GINTHER, et al., 2007; SARTORI et al., 2004; SHAHAM-ALBALANCY et al.; 2000; WOLFENSON et al., 2004). Alguns autores utilizaram o mesmo *kit*, mas fizeram algumas modificações, ou seja, não seguiram as instruções do fabricante (BURKE et al., 2003; ROTH et al., 2012). Outros autores utilizaram uma curva padrão desenvolvida no próprio laboratório, dissolvendo a progesterona no plasma de vacas ovariectomizadas (SHAMAM-ALBALANCY et al.; 2000; WOLFENSON et al., 2004). Em nenhum dos trabalhos supracitados foi realizada extração hormonal das amostras.

Para dosagem de progesterona sérica em ovinos (DIAS, 2011; FURTADO; 2007; LETELIER et al.; 2009; LEYVA; BUCKRELL; WALTON, 1998; PINNA et al., 2012; RUBIANES; UNGERFELD, 1993) e bubalinos (BARUSELLI, 2001; CARVALHO et al., 2013; EL-BATTAWY et al., 2009; FILHO, 2004), autores empregaram o mesmo *kit* comercial. Este *kit*, porém, não é mais comercializado.

Um *kit* comercial que é atualmente comercializado (Progesterone, Immunotech®, Beckman Coulter Company, Marsielle, France) foi utilizado para dosagem de progesterona sérica por outros autores em bovinos (SHAMOUN;

ALNIMER, 2011; WISCHRAL et al., 2001), ovinos (HADEF; MIROUD; KAIDI, 2014; SEJIAN; MAURYA; NAQVI, 2011) e bubalinos (ABDULKAREEM et al., 2012).

Li et al. (2011) utilizaram conjunto diagnóstico (Beijing Northern Biotechnology Institute, Beijing, China) para dosagem de estradiol e progesterona séricas em bubalinos.

Diversos trabalhos mais antigos que estudaram a fisiologia reprodutiva básica de ovinos e bubalinos, realizaram dosagem de progesterona sérica dessas espécies, com protocolos sem utilização de *kits* comerciais e necessidade de extração hormonal, processos mais demorados e complexos (ALECOZAY et al.; 1988; AVENELL; SAEPUDIN; FLETCHER, 1985; KANAI; SHIMIZU, 1984; RAWLINGS; JEFFCOATE; RIEGER, 1984). Ainda podemos encontrar trabalhos mais recentes, já estudando biotécnicas reprodutivas, sem utilização de *kit* comercial. Em 2009, Roy e Prakash (2009) utilizaram um protocolo de 1993, descrito por Kamboji e Prakash (1993) para dosar progesterona em búfalos para estudar indução de ovulação.

Para dosagem de estradiol em soro bovino, foram relatados uso de *kits* comerciais, como por exemplo “Estradiol Double Antibody, Siemens Healthcare Diagnostics, Los Angeles, CA, USA” (AYRES, 2011); “Ultra sensitive estradiol assay, DSL-4800, Diagnostic Systems Laboratory, Webster, TX, USA” (KULICK et al., 1999); “Second Antibody Estradiol, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA” (BERGFELT et al., 2000). Em todos esses casos foram utilizados métodos complexos de extração hormonal e preparação das amostras. Estes *kits* não são mais comercializados. Wischral et al. (2001) utilizaram, em bovinos, o conjunto diagnóstico comercial “Estradiol, Immunotech®, Beckman Coulter Company, Marsielle, France” e não relataram uso de extração. Sejian et al. (2011) utilizaram este *kit* para dosagem de estradiol em ovinos.

Também há relatos de trabalhos com dosagem de estradiol em bovinos sem a utilização de *kits* comerciais. Para citar como exemplo, Burke et al. (2003) utilizaram anticorpo desenvolvido por um laboratório (Dr. N.R. Mason, Lilly Research Laboratories, Indianapolis, IN), como traçador o $^{125}\text{I-E}_2$ (IMS.135; $\text{E}_2\text{-6[O-carboxymethyl-}^2\text{[}^{125}\text{I]iodohistamine}$, Amersham Corporation, Arlington Heights, IL), e como padrão E_2 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Foi realizada dupla extração das amostras com éter dietílico. Wolfenson et al. (2004) utilizaram extração com éter dietílico, anticorpo caprino e traçador $^{125}\text{I-E}_2$ (ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA). Da mesma forma em ovinos, Elmes et al. (2005) não utilizaram conjunto diagnóstico

comercial, mas relatam que a concentração de estradiol foi dosada após extração sérica com éter dietil, uso de padrão da Sigma, traçado [2,4,6,7,16,17-3H]-oestradiol (Amersham International) e anticorpo Biogenesis Ltd (Poole, Dorset, UK).

Existem ainda trabalhos mais antigos utilizando diferentes métodos para a quantificação de estradiol sérico em bovinos (BADINGA et al., 1992; KNICKERBOCKER et al., 1986; KOJIMA et al., 1992; TURZILLO; FORTUNE, 1990). Em 1985, Avenell et al. (1985), utilizaram um protocolo empregado em bovinos para quantificar estradiol em búfalas.

Na dosagem de estradiol sérico em ovinos, Furtado (2007) utilizou o conjunto diagnóstico comercial estradiol 3ª geração duplo anticorpo da DSL – 39100 (Diagnostic System Laboratories, Webster, Texas, USA) e Redmond et al. (2011), após extração com éter metil-terc-butílico, empregou o conjunto diagnóstico comercial Estradiol double antibody (Siemens, Los Angeles, CA, USA).

2.3.2 Enzimaimunoensaio (EIE)

As enzimas são os marcadores mais utilizados na atualidade, com as vantagens de não apresentarem riscos associados à exposição de radioisótopos. Estão disponíveis no mercado vários conjuntos diagnósticos comerciais, que utilizam anticorpos específicos para dosagem de hormônios desenvolvidos para muitas espécies animais. No entanto, ainda é uma metodologia com custo elevado para o uso em grandes quantidades de amostras e só permite a mensuração de um analito por placa (FURTADO, 2007; JOHANNSSON, 1991).

O princípio básico de um enzimaimunoensaio envolve um anticorpo ligado à uma superfície sólida, que então se liga ao hormônio específico a ser dosado, presente no plasma, formando um complexo antígeno-anticorpo. Junto a este complexo é adicionado um anticorpo enzimático, formando um complexo maior, com exposição do componente enzimático para a superfície. Um substrato é, então, adicionado, reagindo com o componente enzimático, gerando uma cor, que é a base do sistema imunoenzimático (SENGER, 2005).

Um exemplo de EIE é o método que utiliza anticorpos imobilizados em uma placa. Em protocolo clássico o método é realizado em oito etapas: 1- ativação da placa, 2- lavagem, 3- imobilização dos anticorpos, 4- lavagem, 5- incubação, 6-

lavagem, 7- adição de substrato cromogênico e 8- leitura óptica (FURTADO, 2007; JOHANNSSON, 1991).

Encontra-se na literatura o uso de enzimaímunoensaio para dosagem de progesterona e estradiol em bovinos, com uso de extração hormonal e anticorpo IgG caprino (RASMUSSEN et al., 1996; SARTORI et al., 2004).

Em ovinos, Furtado (2007) utilizou o anticorpo monoclonal anti-progesterona clone 425 (CL 425), a progesterona conjugada 3-O-carboxymetiloxime (HRP) e o padrão de progesterona (Progesterone, minimum 99%, cód P0130 – Sigma-Aldrich) na dosagem de progesterona.

Em bubalinos, esta técnica foi empregada por Banu et al. (2012), em trabalho que reporta com detalhes protocolo para dosagem de progesterona no leite de búfalas e por Kumar et al. (2012) para dosagem de progesterona e estradiol em fluido folicular na mesma espécie. Na matriz sérica, Roy e Prakash (2009) descrevem em detalhes o uso de EIE heterólogo ultrassensível, após extração hormonal com benzeno, na dosagem de estradiol, utilizando o anticorpo (Es-6-CMO-BSA; E2/3/pool1; Instituteur Physiologie, Freising-Weihenstephan, Germany).

2.3.3 Quimioluminescência

O método de quimioluminescência é um fenômeno pelo qual se obtém energia luminosa a partir de uma reação química. Esse imunoensaio utiliza um sistema que se baseia em unidades-teste, recobertos com anticorpo específico, como ensaio em fase sólida, servindo como recipiente para reação imune, a incubação, a lavagem e o desenvolvimento do sinal luminoso (SING et al., 1997).

Essa técnica possui como vantagens: praticidade de execução e menor variação durante a pipetagem, pois o operador só precisa acrescentar a amostra nos tubos, sendo os demais reagentes adicionados pelo próprio equipamento; não utilização de material radioativo; prazos maiores de validade e a possibilidade de execução de mais de um teste diferente em uma mesma amostra de uma única vez, oferecendo maior rapidez para obtenção dos resultados. Entretanto, algumas desvantagens são notadas como menor sensibilidade e dificuldades no processo de validação do método, por ser um sistema fechado de análise, ou seja, um sistema

automatizado, que não permite ao executor interferir nas diferentes etapas do processo (LIMA, 2012).

A mensuração da progesterona plasmática por quimioluminescência é o método utilizado na rotina laboratorial na medicina humana para superar as desvantagens do radioimunoensaio, mantendo a especificidade e a sensibilidade. Há trabalhos publicados que utilizaram a técnica de quimioluminescência na medicina veterinária, por exemplo em dosagem de progesterona em caninos (VOLKMANN, 2006; TAHIR et al., 2013), porém ainda há a necessidade de mais estudos para melhor avaliação desta técnica em animais (LIMA, 2012).

2.3.4 Tecnologia xMAP-Multiplex®

O xMAP-Multiplex® (*multiple analyte profile*) é uma tecnologia que foi desenvolvida pela empresa LUMINEX®. Esta tecnologia envolve um processo que cora internamente microesferas magnéticas de 6,2 µm (as *Beads*). São utilizadas misturas de dois ou três corantes fluorescentes. Utilizando-se uma proporção precisa destes fluorocromos, são criados 50 ou 100 conjuntos de microesferas com cores diferentes, que emitem diferentes intensidades de vermelho. Cada conjunto de microesferas está acoplado com anticorpo de captura específico, que se liga ao analito em questão. As microesferas são combinadas em um único poço de reação e podem dosar até 100 analitos simultaneamente. Após a adição do anticorpo de detecção biotinilado, este se liga ao analito. O resultado final é amplificado através de incubação com o conjugado estreptavidina-ficoeritrina, emitindo sinal fluorescente que é então quantificado por um dos três sistemas Luminex® (FLEXMAP 3D®; Luminex 200® ou MAGPIX®). O *software* do sistema xPONENT® converte a intensidade da fluorescência na unidade desejada.

Os equipamentos FLEXMAP 3D® e Luminex 200® utilizam para leitura duplo sistema de lasers que incide sobre as microesferas à medida que fluem através do fluxo celular. Um feixe de laser detecta a microesfera pelo código de cor específico para cada ensaio e o outro laser quantifica o sinal. O equipamento MAGPIX® utiliza para leitura luzes LED (*light emitting diod*), que excitam as *Beads* e câmara CCD (*charged coupled device*), que as identifica e quantifica (GENESE, 2010; MILLIPLEX LUMINEX MEETING, 2013; MILLIPORE, 2013).

As vantagens deste sistema quando comparado a outros imunoensaios para dosagem de progesterona e estradiol é a otimização dos ensaios, pois faz uma avaliação múltipla dos dois hormônios; maior amplitude da faixa de dosagem; e menor limite de detecção (MILLIPLEX LUMINEX MEETING, 2013; MILLIPORE, 2013). As desvantagens incluem a necessidade de extração hormonal e, conseqüentemente, maior volume de amostra, além da necessidade de incubação *overnight*, aumentando o tempo para obtenção dos resultados.

2.4 VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO

O desenvolvimento de um método analítico, a adaptação ou implementação de um método conhecido, envolve processos de avaliação que estime sua eficiência na rotina do laboratório. O objetivo da validação consiste em demonstrar que o método analítico é adequado para o seu propósito (BRITO, et al., 2003). A validação de um método vai além de uma simples comparação entre resultados de uma mesma amostra dosada em diferentes métodos, envolve processos complexos e extremamente elaborados (FURTADO, 2007).

A literatura dispõe de trabalhos que relatam a validação de métodos analíticos e definem critérios que devem ser seguidos durante o seu desenvolvimento. Dentre esses, os parâmetros de validação de método analítico mais usualmente empregados envolve a especificidade, dose resposta, linearidade, sensibilidade, limite de detecção, precisão, exatidão e recuperação. Determinado método é considerado validado se suas características estiverem de acordo com os pré-requisitos estabelecidos (BRASIL, 2012; BRITO et al., 2003).

Furtado (2007) relata que há validação fisiológica quando os resultados obtidos, neste caso os valores obtidos das concentrações hormonais de progesterona e estradiol, demonstram que é possível detectar as diferentes concentrações hormonais ao longo do ciclo estral em dois momentos fisiológicos distintos: fase folicular e fase lútea.

HIPÓTESE

3 HIPÓTESE

Os valores encontrados nas dosagens de estradiol e progesterona pela técnica de imunoensaio multianalito (xMAP-Multiplex®) confirmam o esperado para a fisiologia reprodutiva e permitem estabelecer o perfil estrogênico e progesterônico das espécies em estudo (bovina, ovina e bubalina).

OBJETIVOS

4 OBJETIVOS

- dosar progesterona e estradiol séricos de vacas, búfalas e ovelhas pela técnica xMAP-Multiplex®, com o *kit* Multi Species Steroid/Thyroid Hormone (STTHMAG-21K; Millipore, Billerica, MA);
- verificar a hipótese de que os valores encontrados confirmam o esperado para a fisiologia reprodutiva das espécies em estudo;
- demonstrar a aplicabilidade da utilização desta técnica e fazer sua validação fisiológica para dosagem de estradiol e progesterona nestas espécies;
- dosar estradiol sérico nestas espécies por radioimunoensaio com o *kit* Ultra Sensitive Estradiol (Beckman Coulter®, Marsielle, France) com e sem extração por acetonitrila e comparar os resultados com os obtidos pela técnica xMAP-Multiplex®.

MATERIAL E MÉTODOS

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS E LOCAL DO EXPERIMENTO

5.1.1 Ovelhas

Foram utilizadas 5 ovelhas mestiças Santo Inês (O1, O2, O3, O4 e O5), híbridas, com escore corporal variando entre 3 e 4, em idades reprodutivas, múltiparas. O experimento foi realizado nas instalações do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (23° S, São Paulo, Brasil), com início em agosto de 2015. A alimentação (ração e feno) era fornecida duas vezes por dia (de manhã e à tarde) e sal mineral e água eram fornecidos à vontade. Os animais já estavam adaptados ao ambiente (Figura 4) e, para minimizar o estresse, uma vez que este pode suprimir o desenvolvimento folicular, foi realizado um manejo de adaptação aos pesquisadores. Este manejo constituiu-se basicamente em entrar na baia com um punhado de ração e esperar que os animais se aproximassem. Pela repetição deste reforço positivo durante o experimento, observou-se que os animais permaneceram calmos e confiantes durante as coletas de sangue (DIAS, 2011; DIAS, 2015).

Figura 4 - Baia dos ovinos utilizados no experimento

5.1.2 Vacas

Foram utilizadas 5 novilhas taurinas (V1, V2, V3, V4 e V5). O experimento foi realizado nas instalações do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga.

Os animais foram mantidos em um piquete de capim *Brachiaria decumbens* e suplementados com concentrado e cana de açúcar picada e acesso livre à água e ao sal mineral.

5.1.1 Búfalas

Foram selecionadas 5 novilhas búfalas (dentre 12 novilhas) (B1, B2, B3, B4 e B5), híginas, com idade média de 32,8 ($\pm 2,3$) meses e peso médio de 436,6 ($\pm 30,1$) kg. Essas cinco novilhas foram selecionadas por terem apresentado um ciclo completo. O experimento foi realizado na Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Registro (24° S, Registro, Brasil), do Departamento de Descentralização do Desenvolvimento, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, com início em junho de 2015.

5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

5.2.1 Ovelhas

As coletas foram realizadas durante a estação reprodutiva. Foram aplicadas duas doses de um análogo sintético de prostaglandina F₂ α (Dinoprost Trometamina, Lutalyse®). As ovelhas em estro foram identificadas pelo uso de rufião. A cobertura foi permitida em O2 e O4. A observação do comportamento de estro das ovelhas foi realizada duas vezes por dia. Nas ovelhas em que o estro era identificado, se iniciaram imediatamente as coletas de sangue, que foram diárias nos primeiros 5 dias e a cada dois dias por mais 10 a 14.

5.2.2 Vacas

Para sincronização do estro foram aplicadas duas doses de prostaglandina F2 α (D-cloprostrenol, 150 μ g, intra-muscular, Prolise®), com 14 dias de intervalo. Para assessorar na detecção do estro foi utilizado um touro previamente esterilizado pela técnica de epididimacaudectomia. O estro foi detectado tanto por meio de observação visual, que ocorreu duas vezes por dia, como pelo uso de adesivo Estroprotect (Estroprotect™, Rockway Inc., WI, EUA). O adesivo foi fixado sobre a região sacral. O momento da ovulação (D0) foi detectada por exame ultrassonográfico dos ovários (Aloka® SSD-500 Micrus, 7,5 MHz). Este exame foi realizado diariamente para identificar o fim do ciclo, ou seja, o momento de uma nova ovulação (Dov). As coletas de sangue foram diárias de D0 a D9 e a cada dois dias a partir de D9 até o fim do ciclo.

5.2.3 Búfalas

Para sincronização do estro foram feitas duas aplicações de prostaglandina (PGF2 α) com intervalo de 11 dias. Exame ultrassonográfico dos ovários foi realizado no dia da primeira aplicação e diariamente após a segunda aplicação de prostaglandina. O dia da ovulação após a 2^a aplicação de PGF2 α foi considerado como D0. Foi considerado ciclo completo quando as novilhas ovularam no D0 e apresentaram uma segunda ovulação ao final do ciclo estral (Dov). As coletas de sangue foram diárias de D0 a D9 e a cada dois dias de D9 a Dov.

5.3 COLETA DE SANGUE E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

Coletas de sangue em cada animal foram realizadas através da punção de veia jugular, alternando-se os lados em cada coleta, após antissepsia com álcool iodado, utilizando-se agulhas hipodérmicas 25x8 e seringas descartáveis, com a retirada de 5 a 10 mL de sangue total. O sangue foi colocado em tubos de coleta com gel ativador de coagulação. Os tubos foram centrifugados a 1500g por 30 minutos e o soro obtido (Figura 5) foi acondicionado em micro tubos de 1,5 mL de

polietileno. Os micro tubos foram devidamente identificados e congelados em *freezer* a - 20oC até a etapa subsequente de dosagem hormonal.

Figura 5 – Soro sanguíneo de ovelha obtido após centrifugação

5.4 DOSAGENS HORMONAIS

5.4.1 Milliplex®

As concentrações séricas de progesterona e estradiol dos animais do estudo foram obtidas pelo MILLIPLEX® MAP *Multi Species Steroid kit* (STTHMAG-21K; Millipore, Billerica, MA). Foram utilizados 4 kits, sendo dois em um ensaio e dois em um segundo ensaio. As dosagens foram realizadas no laboratório do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (São Paulo, Brasil).

Primeiramente foi realizada a preparação das amostras, ou seja, elas passaram por um processo de extração pela técnica de precipitação com acetonitrila, de

acordo com as recomendações do fabricante (MILLIPORE, 2013). Para este processo foram utilizados 250 μL de amostra. Esta quantidade de amostra, junto com 375 μL de acetonitrila, foi centrifugada a 17000g por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e transferido para tubos de polipropileno com tampas (12x75mm) e passaram por processo de liofilização em aparelho evaporador giratório tipo *Speed Vac* (Speed vac – Sc110, Savant®). A reconstituição foi feita com 200 μL de água deionizada.

As demais etapas também seguiram estritamente as recomendações do fabricante e envolveram:

Dia 1

- Preparação das *Beads*: banho sonificador por 30 segundos, *vortex* por 1 minuto e adição de tampão.
- Preparação dos controles de qualidades: reconstituição com água deionizada.
- Preparação do tampão de lavagem: diluição em água deionizada.
- Preparação do padrão: reconstituição em água deionizada e diluição seriada.
- Preparação da placa: são adicionados 200 μL de tampão de lavagem em todos os poços; a placa é colocada por 10 minutos em *shaker* (500 a 800 rpm) em temperatura ambiente, e o conteúdo é decantado. Posteriormente são adicionados 25 μL de tampão de lavagem em todos os poços. O padrão, os controles e as amostras são pipetadas em seus respectivos poços. Finalmente são pipetados o conjugado e as *Beads*.
- Incubação *overnight* (16 a 20 horas a 4°C)

Dia 2

- Lavagem: 4 lavagens (para esta etapa a placa é acoplada a um suporte com imã, para que as *Beads* magnéticas permaneçam na placa) (Figura 6)
- Adição do anticorpo de detecção em todos os poços
- Nova incubação por 1 hora em temperatura ambiente
- Adição de estreptavidina-ficoeritrina
- Nova incubação por 1 hora e mais duas lavagens
- Adição de *drive fluid*

A leitura das placas foi realizada no equipamento MAGPIX®.

As dosagens foram feitas em duplicata.

Figura 6 -. Suporte magnético para realização das lavagens das placas

5.4.2 Radioimunoensaio

As dosagens por radioimunoensaio de estradiol foram realizadas através do conjunto diagnóstico comercial *Ultra-Sensitive Estradiol* (Beckman Coulter, Masielle, France) no Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH) do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. O ensaio foi realizado seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Foi selecionado um animal de cada espécie ao acaso (O3, V4 e B1) e as amostras foram dosadas em duplicata com e sem passar previamente pelo processo de extração hormonal por precipitação com acetonitrila.

5.5 ANÁLISES DOS RESULTADOS

As análises estatísticas dos resultados e os gráficos foram realizados utilizando os programas Excel® (Microsoft Office 2013) e SPSS Statistics® 24.0 (IBM).

Para descrição dos resultados, foram empregadas as médias e seus respectivos erros padrões dos dados originais.

Os dados foram testados quanto à distribuição normal pelos testes de Kolgomorov-Smirnov e Shapiro-Wilk e quanto à homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene, ambos com 5% de significância.

O teste t de Student ($p \leq 0,5$) foi utilizado para comparar duas médias e o teste ANOVA (análise de variância) unifatorial ($p \leq 0,05$) para comparar mais de duas médias de uma variável independente com distribuição normal e homogeneidade de variância. Foi aplicado o teste de Tukey para comparação das médias duas a duas.

O teste de Kruskal Wallis e Mann Whitney ($p \leq 0,05$) foi utilizado para comparar médias de uma variável independente quando os dados não tivessem uma distribuição normal e homogeneidade de variância.

O teste de correlação de Pearson foi utilizado para verificar a correlação entre duas variáveis paramétricas ($p = 0,01$)

RESULTADOS

6 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste estudo estão apresentados a seguir.

6.1 PARÂMETROS DE QUALIDADE DOS ENSAIOS HORMONAIS

O controle de qualidade do ensaio de estradiol por RIE foi realizado através da análise do coeficiente de variação inter-ensaio, que foi inferior a 10% e sensibilidade mínima detectada, que foi 1,6 pg/mL (Tabela 1).

Tabela 1 – Controle de qualidade obtido no ensaio hormonal de estradiol por RIE

	CPM	Cap. Lig.	L.N.E.	Sensibilidade	CV Intra	CV Intra
Ensaio	total	B/B0	(%)	% (dose pg/mL)	Baixo	Alto
1	8778	45%	1,34%	92 (1,60)	5,67%	2,21%

Legenda:

CPM: contagens por minuto

Cap. Lig.: capacidade de ligação

L.N.E.: ligação não específica

CV intra: coeficiente de variação intra-ensaio

O controle de qualidade dos ensaios MILLIPLEX® foi realizado pelo coeficiente de variação (CV) intra e interensaio, que foram menores que 10% e sensibilidade mínima detectada, que foi de 0,01 ng/mL para o estradiol e 0,02 ng/mL e 0,09 ng/mL para a progesterona nos dois ensaios realizados (Figura 7).

Ensaio 1

Ensaio 2

Legenda:

MFI: *median fluorescent intensity* (intensidade fluorescente média)

CV: coeficiente de variação

R^2 : coeficiente de determinação

Figura 7 – Curvas padrão de estradiol e progesterona obtidas nos ensaios Milliplex® 1 e 2

6.2 MILLIPLEX®

6.2.1 Ovelhas

Os resultados referentes às dosagens séricas de progesterona e estradiol dos animais O1, O2, O3, O4 e O5 obtidos pelo MILLIPLEX® estão demonstrados nos gráficos 1 a 5 a seguir.

Gráfico 1 – Representação gráfica das concentrações séricas de estradiol (ng/mL) e progesterona (ng/mL) em O1 de D1 a D15

Gráfico 2 – Representação gráfica das concentrações séricas de estradiol (ng/mL) e progesterona (ng/mL) em O2 de D1 a D15

Gráfico 3 – Representação gráfica das concentrações séricas de estradiol (ng/mL) e progesterona (ng/mL) em O3 de D1 a D17

Gráfico 4 – Representação gráfica das concentrações séricas de estradiol (ng/mL) e progesterona (ng/mL) em O4 de D1 a D19

Gráfico 5 – Representação gráfica das concentrações séricas de estradiol (ng/mL) e progesterona (ng/mL) em O5 de D1 a D19

Os perfis da progesterona e estradiol séricos foram obtidos através das médias das concentrações destes hormônios de cada um destes animais e estão apresentados nos gráficos 6 a 8 e tabelas 2 e 3 a seguir.

Gráfico 6 – Representação gráfica do comportamento das médias e seus respectivos erros padrão das medidas de progesterona sérica (ng/mL) em O1, O2, O3, O4 e O5 de D1 a D19

Tabela 2 – Médias e seus respectivos desvios padrão (d.p.) e erros padrão (e.p.) das concentrações séricas de progesterona (ng/mL) obtidas de O1, O2, O3, O4 e O5 de D1 a D19

dia	n	média	d.p.	e.p.	
D1	5	0,14	0,27	0,12	A
D2	5	0,11	0,19	0,08	A
D3	5	0,26	0,44	0,20	A
D4	5	0,29	0,35	0,16	A, B
D5	5	0,29	0,59	0,26	A, C
D7	5	2,60	2,55	1,14	C, D
D9	5	2,61	2,95	1,32	D
D11	5	2,19	1,69	0,76	C, D
D13	5	2,15	1,80	0,80	D
D15	5	2,41	2,35	1,05	C, D
D17	3	1,74	1,52	0,88	B, C, D
D19	2	3,21	1,73	1,22	B, C, D
TOTAL	55	1,39	1,86	0,25	

* Médias com letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Kruskal Wallis ($p > 0,05$)

Gráfico 7 – Representação gráfica do comportamento das médias e seus respectivos erros padrão das medidas de estradiol sérico (ng/mL) em O1, O2, O3, O4 e O5 de D1 a D19

Tabela 3 – Médias e seus respectivos desvios padrão (d.p.) e erros padrão (e.p.) das concentrações séricas de estradiol (ng/mL) obtidas de O1, O2, O3, O4 e O5 de D1 a D19

dia	n	média	d.p.	e.p.
D1	5	0,24	0,08	0,04
D2	5	0,18	0,09	0,04
D3	5	0,23	0,12	0,05
D4	5	0,21	0,11	0,05
D5	5	0,21	0,16	0,07
D7	5	0,18	0,09	0,04
D9	5	0,24	0,15	0,07
D11	5	0,18	0,07	0,03
D13	5	0,28	0,19	0,08
D15	5	0,16	0,16	0,07
D17	3	0,19	0,21	0,12
D19	2	0,17	0,08	0,06
TOTAL	55	0,218	0,13	0,02

Gráfico 8 – Representação gráfica do comportamento das médias das medidas de estradiol e progesterona sérica (ng/mL) em O1, O2, O3, O4 e O5 de D1 a D19

6.2.2 Vacas

Os resultados referentes às dosagens séricas de progesterona e estradiol dos animais V1, V2, V3, V4 e V5 obtidos pelo MILLIPLEX® estão demonstrados nos gráficos 9 a 13 a seguir.

Gráfico 9 – Representação gráfica das concentrações séricas de estradiol (ng/mL) e progesterona (ng/mL) em V1 de D0 a D23

Gráfico 10 – Representação gráfica das concentrações séricas de estradiol (ng/mL) e progesterona (ng/mL) em V2 de D0 a D19

Gráfico 11 – Representação gráfica das concentrações séricas de estradiol (ng/mL) e progesterona (ng/mL) em V3 de D0 a D25

Gráfico 12 – Representação gráfica das concentrações séricas de estradiol (ng/mL) e progesterona (ng/mL) em V4 de D0 a D19

Gráfico 13 – Representação gráfica das concentrações séricas de estradiol (ng/mL) e progesterona (ng/mL) em V5 de D0 a D23

Os perfis da progesterona e estradiol séricos foram obtidos através das médias das concentrações destes hormônios de cada um destes animais e estão apresentados nos gráficos 14 a 16 e tabelas 4 e 5 a seguir.

Gráfico 14 – Representação gráfica do comportamento das médias e seus respectivos erros padrão das medidas de progesterona sérica (ng/mL) em V1, V2, V3, V4 e V5 de D0 a D23

Tabela 4 – Médias e seus respectivos desvios padrão (d.p.) e erros padrão (e.p.) das concentrações séricas de progesterona (ng/mL) obtidas de V1, V2, V3, O4 e V5 de D1 a D23

dia	n	média	d.p.	e.p.	
D0	5	0,02	0,01	0,00	A
D1	5	0,13	0,25	0,11	A
D2	5	0,06	0,05	0,02	A
D3	5	0,53	0,70	0,31	A
D4	5	2,18	1,47	0,66	A, B
D5	5	2,18	2,58	1,15	A, B, C
D6	5	1,94	1,34	0,60	A, B
D7	5	4,63	2,16	0,97	A, B, C
D8	5	6,25	5,34	2,39	A, B, C
D9	5	7,99	5,82	2,60	B, C
D11	5	8,36	2,81	1,26	B, C
D13	5	9,15	4,45	1,99	C
D15	5	6,20	2,23	1,00	A, B, C
D17	5	4,44	2,72	1,22	A, B, C
D19	5	2,25	2,89	1,29	A, B
D21	3	2,41	3,36	1,94	A, B, C
D23	3	0,18	0,27	0,16	A
TOTAL	81	3,58	4,01	0,45	

* Médias com letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p > 0,05$)

Gráfico 15 – Representação gráfica do comportamento das médias e seus respectivos erros padrão das medidas de estradiol sérico (ng/mL) em V1, V2, V3, V4 e V5 de D0 a D23

Tabela 5 – Médias e seus respectivos desvios padrão (d.p.) e erros padrão (e.p.) das concentrações séricas de estradiol (ng/mL) obtidas de V1, V2, V3, O4 e V5 de D1 a D23

dia	n	média	d.p.	e.p.
D0	5	0,14	0,19	0,08
D1	5	0,24	0,21	0,09
D2	5	0,17	0,11	0,05
D3	5	0,09	0,10	0,04
D4	5	0,31	0,33	0,15
D5	5	0,31	0,08	0,04
D6	5	0,09	0,08	0,04
D7	5	0,08	0,08	0,04
D8	5	0,09	0,11	0,05
D9	5	0,02	0,03	0,01
D11	5	0,05	0,05	0,02
D13	5	0,16	0,07	0,03
D15	5	0,25	0,16	0,07
D17	5	0,36	0,32	0,14
D19	5	0,24	0,25	0,11
D21	3	0,24	0,21	0,12
D23	3	0,22	0,24	0,14
TOTAL	81	0,16	0,18	0,02

Gráfico 16 – Representação gráfica do comportamento das médias das medidas de estradiol e progesterona séricas (ng/mL) em V1, V2, V3, V4 e V5 de D0 a D23

6.2.3 Búfalas

Os resultados referentes às dosagens séricas de progesterona dos animais B1, B2, B3, B4 e B5 estão demonstrados nos gráficos 17 a 21 a seguir. Em 86,91% das amostras destes animais, os resultados referentes às dosagens séricas de estradiol deram valores abaixo ou acima do limite de detecção, não sendo possível estabelecer um perfil deste hormônio nesta espécie.

Gráfico 17 – Representação gráfica das concentrações séricas de progesterona (ng/mL) no animal B1 de D1 a Dov

Gráfico 18 – Representação gráfica das concentrações séricas de progesterona (ng/mL) em B2 de D1 a Dov

Gráfico 19 – Representação gráfica das concentrações séricas de progesterona (ng/mL) em B3 de D1 a Dov

Gráfico 20 – Representação gráfica das concentrações séricas de progesterona (ng/mL) em B4 de D1 a Dov

Gráfico 21 – Representação gráfica das concentrações séricas de progesterona (ng/mL) em B5 de D1 a Dov

O perfil da progesterona sérica foi obtido através da média das concentrações destes hormônios em cada um destes animais de D1 a D23, o primeiro dia em que todos os animais apresentaram concentrações de progesterona $<1,0$ ng/mL, e está apresentado no gráfico 22 e tabela 6 a seguir.

Gráfico 22 – Representação gráfica do comportamento das médias e seus respectivos erros padrão das medidas de progesterona sérica (ng/mL) em B1, B2, B3, B4 e B5 de D1 a D23

Tabela 6 – Médias e seus respectivos desvios padrão (d.p.) e erros padrão (e.p.) das concentrações séricas de progesterona (ng/mL) obtidas de B1, B2, B3, B4 e B5 de D1 a D23

dia	n	média	d.p.	e.p.	
D1	5	0,11	0,08	0,04	A
D2	5	0,45	0,32	0,14	A
D3	5	1,04	1,03	0,46	A
D4	5	2,54	3,21	1,44	A
D5	5	2,54	3,17	1,42	A
D6	5	8,04	10,49	4,69	A, B
D7	5	5,29	3,73	1,67	A, B
D8	5	10,82	8,37	3,74	A, B
D9	5	16,61	15,02	6,72	B
D11	5	8,18	6,09	2,72	A, B
D13	5	9,80	4,59	2,05	A, B
D15	5	10,23	5,80	2,59	A, B
D17	5	7,21	4,02	1,80	A, B
D19	5	1,80	2,38	1,06	A
D21	5	1,39	2,90	1,30	A
D23	3	0,32	0,40	0,23	A
TOTAL	78	5,52	7,20	0,82	

* Médias com letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p > 0,05$)

6.2 RIE

Os resultados referentes a dosagem sérica de estradiol sem extração em O3 estão demonstrados no gráfico 23 a seguir. A análise de correlação destes resultados com os resultados obtidos pelo Milliplex® nas mesmas amostras foi realizada pelo teste de correlação de Person e esta correlação é negativa (-0,948) (gráfico 24), ou seja, não há nenhuma correlação entre os dois testes.

Todas as amostras de V4 deram resultados abaixo do limite de detecção e apenas 3 amostras de B1 (D5, D6 e D7) não deram resultados abaixo do limite de

deteção. Os valores encontrados foram respectivamente 4,62 pg/mL; 4,41 pg/mL e 3,97 pg/mL (resultados sem extração).

Todas as mostras dosadas após extração com ecetonitrila deram resultados abaixo do limite de detecção, sugerindo que este método não é adequado para extração hormonal para dosagem de estradiol por RIE nestas espécies.

Gráfico 23 – Representação gráfica das concentrações séricas de estradiol por RIE (pg/mL) em O3 de D1 a D17

Gráfico 24 – Representação gráfica da regressão linear, mostrando a relação negativa entre as concentrações séricas de estradiol obtidas por RIE e Milliplex® em O3

DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

7.1 OVELHAS

Os resultados obtidos pela técnica Milliplex® mostraram que, nas ovelhas, a progesterona apresentou valores $>1,0$ ng/mL, ou seja, os animais entraram na fase lútea do ciclo estral, na média em D7. Estes valores não retornaram a $<1,0$ ng/mL posteriormente durante o período do estudo, pois dois animais do experimento (O2 e O4) foram cobertos, ficaram prenhes e, portanto, não ocorreu luteólise nestes animais. Além disso, é possível observar que em O1 e O5 houve tendência nas concentrações de progesterona para retornar a seus valores basais, mas, provavelmente devido à limitada duração na coleta das amostras, este fato não ocorreu. Por essas razões, não foi possível estabelecer a duração média do ciclo estral nestes animais.

Em O3, único animal em que foi possível observar uma fase lútea completa, os valores de progesterona elevaram-se para $>1,0$ ng/mL em D7 e retornaram para $<1,0$ ng/mL em D15 e, portanto, a fase lútea durou 8 dias, dados compatíveis aos relatados na literatura (BARTLEWISKI; BABY; GIFFIN; 2011). Neste animal a concentração progesterônica média na fase folicular foi de $0,50 (\pm 0,25)$ ng/mL e na fase lútea de $4,72 (\pm 2,02)$ ng/mL. Estes valores foram semelhantes aos relatados por Furtado (2007) ($0,55$ ng/mL e $5,48$ ng/mL, respectivamente).

O valor médio de E2 encontrado foi de $0,218 (\pm 0,02)$ ng/mL, sendo $0,220 (\pm 0,019)$ ng/mL na fase folicular e $0,214 (\pm 0,034)$ ng/mL na fase lútea, e não há diferença significativa entre esses valores (teste t; $p < 0,05$). Além disso os valores de estradiol não diferem entre si estatisticamente em cada um dos dias durante o ciclo estral (ANOVA; $p < 0,05$).

7.2 VACAS

Nos bovinos os momentos de duas ovulações subsequentes foram detectados com o auxílio de exame ultrassonográfico, o que tornou possível determinar a duração exata do ciclo estral de cada animal. A duração média do ciclo estral foi de 21,4 ($\pm 2,24$) dias, dados compatíveis aos relatados na literatura, que é de 18 a 24 dias, com média de 21 dias (FORDE et al., 2011; SENGGER, 2005).

Os resultados obtidos pela técnica Milliplex® mostraram que, na média, a concentração de progesterona elevou-se para $>1,0$ ng/mL em D4, iniciando-se a fase lútea. A duração média da fase lútea foi de 13,4 ($\pm 1,44$) dias. A literatura descreve duração de 14 a 18 dias (FORDE et al., 2011).

A concentração média de progesterona em bovinos na fase folicular foi de 0,17 ($\pm 0,04$) ng/mL e na fase lútea de 5,70 ($\pm 0,53$) ng/mL. Em todas as fases os valores médios de progesterona foi de 3,58 ($\pm 0,45$) ng/mL. Santiago et al. (2011) relata valores de 2,54 ng/mL em animais de ciclo de 21 dias e de 4,27 ng/mL nos de ciclo superiores, portanto um resultado intermediário entre estes dois valores.

Como neste delineamento experimental D0 foi considerado o dia da ovulação, e o estro se estende até a ovulação do folículo dominante, temos em um primeiro momento a fase lútea (metaestro e diestro) e, após a luteólise, com diminuição na concentração de progesterona, o início do proestro. Podemos observar nos resultados que a progesterona alcança seu valor máximo em D13 (9,15 ng/mL) e a partir de então sua concentração começa a diminuir. Simultaneamente, a partir de D13, os valores de estradiol começam a se elevar e alcançam seu valor máximo em D17 (0,36 ng/mL). Entretanto os valores de estradiol não diferem entre si estatisticamente em cada um dos dias durante o ciclo estral pelo teste de Kuskal Wallis ($p < 0,05$).

A maior concentração de estradiol, que foi de 0,36 ng/mL ou 360 pg/mL, é um valor muito acima do encontrado por Sartori et al. (2004) por RIE, que foi de 16,7 pg/mL, o que mostra que os valores das concentrações de estradiol obtidas pela técnica Milliplex® são bastante superiores aos obtidos por RIE.

A concentração média de estradiol foi de 0,16 ($\pm 0,02$) ng/mL, sendo que durante a fase folicular foi de 0,21 ($\pm 0,03$) ng/mL e durante a fase lútea foi de 0,15 ($\pm 0,02$) ng/mL e não há diferença significativa entre esses valores entre as duas fases (teste de Mann-Whitney; $p < 0,05$).

7.1 BÚFALAS

Nos bubalinos os momentos de duas ovulações subsequentes foram detectados com o auxílio de exame ultrassonográfico, portanto foi possível determinar a duração exata do ciclo estral de cada animal. A duração média do ciclo estral foi de 23,6 ($\pm 1,44$) dias, dados compatíveis os relatados na literatura (WARRIACH et al., 2015).

Nos bubalinos o aumento na concentração de progesterona para $>1,0$ ng/mL ocorreu em D3 e a duração média da fase lútea foi de 14,6 ($\pm 1,17$) dias, dados também consistentes com os relatados na literatura (BARUSELLI et al., 1997; WARRIACH et al., 2015).

A concentração média de progesterona foi de 5,52 ($\pm 0,82$) ng/mL. Na fase lútea foi de 8,32 ($\pm 1,06$) ng/mL e na folicular foi de 0,24 (0,05) ng/mL. Kanai e Shimizu (1984), ao dosarem progesterona sérica por RIE de 5 búfalas, relataram que os valores desse hormônio começaram a aumentar a partir de D5 (considerando D0 o dia do início do estro) e alcançou o platô em D10. Esses resultados são bastante similares aos encontrados em nosso estudo, em que os valores de progesterona se elevaram significativamente a partir de D6 e alcançaram o platô em D9. O valor do platô encontrado por estes autores (2,7 ng/mL) foi, porém, bastante inferior ao encontrados por nós (6,72 mg/mL), devido provavelmente à deferente técnica usada para mensuração.

CONCLUSÃO

8 CONCLUSÃO

Nas condições em que o experimento foi conduzido, podemos concluir que:

- não é possível dosar estradiol sérico em búfalas pela técnica xMAP-Multiplex®, com o *kit* Multi Species Steroid/Thyroid Hormone (STTHMAG-21K; Millipore, Billerica, MA) e os valores de estradiol encontrados em ovelhas e vacas por esta técnica não correspondem aos esperados para a fisiologia reprodutiva dessas espécies, portanto não há aplicabilidade desta técnica para avaliar o perfil estrogênico nestas espécies;
- não é possível dosar estradiol por radioimunoensaio com o *kit* Ultra Sensitive Estradiol (Beckman Coulter®, Marseille, France) em vacas e búfalas e os valores encontrados durante o ciclo estral de um ovino não correspondem aos esperados para a fisiologia da espécie;
- os valores de progesterona sérica dosados nas espécies do estudo pela técnica xMAP-Multiplex®, com o *kit* Multi Species Steroid/Thyroid Hormone (STTHMAG-21K; Millipore, Billerica, MA) correspondem aos esperados para a fisiologia reprodutiva dessas espécies, é uma técnica que pode ser aplicada para avaliação do perfil progesterônico e foi validada fisiologicamente.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABDULKAREEM, T. A.; EIDAN, S. M.; ISHAK, M. A.; AL-SHARIFI, A. 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 placenta characteristics of Iraq riverine buffalo (*Bubalus bubalis*). **Animal Reproduction Science**, v. 130, n. 1-2, p. 33-41, 2012.
- ABRAHAM, G. E. Radioimmunoassay for serum estradiol. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 29, p. 866-871, 1969.
- ALAÇAM, E.; AY, S. S.; SABAN, E. The evaluation of various radioimmunoassay progesterone kits for different stage of reproductive period in the cow, sheep and bitch. **Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, v. 56, n. 1, p. 37-41, 2009.
- ALECOZAY, A. A.; SELGER, K. W.; CLARK, J. R.; BURNS, J. M.; NORMAN, R. L.; NISWENDER, G. D.; LEAVITT, W. W. Pattern of ovarian p4 secretion during the luteal phase of the ovine estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v. 39, n. 2, p. 287-294, 1988.
- ALMEIDA, H. B.; VIANA, W. G.; ARRUDA, R. P.; OLIVEIRA, C. A. Sincronização de estro e dinâmica folicular de éguas crioulas submetidas a tratamentos com norgestomet, acetato de melengestrol e altrenogest. **Brazilian Journal of Veterinary research and Animal Science**, v. 38, n. 6, p. 267-272, 2001.
- AVENELL, J. A.; SAEPUDIN, Y.; FLETCHER, I. C. Concentrations of LH, oestradiol-17 β and progesterone in the peripheral plasma of swamp buffalo cows (*Bubalus bubalis*) around the time of oestrus. **Journals of Reproduction & Fertility**, v. 74, n. 2; p. 419-424, 1985.
- AYRES, H. **O uso de FSH exógeno estimula o crescimento folicular final e a função luteínica de vacas Holandesas em lactação sincronizadas para Inseminação artificial em Tempo Fixo?** 2011. 114 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

BADINGA, I.; DRIANCOURT, M. A.; SAVIO, J. D.; WOLFENSON, D.; DROST, M.; DE LA SOTA, R. L.; THATCHER, W. W. Endocrine and Ovarian Responses associated with the first-wave dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 47, p. 871-883, 1992.

BANU, T. A.; SHAMSUDDIN, M.; BHATTACHARJEE, J.; ISLAM, M. F.; KHAN, S.; AHMED, J. U. Milk progesterone enzyme-linked immunosorbent assay as a tool to investigate ovarian cyclicity of water buffaloes in relation to body condition score and milk production. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 54, n. 1, 2012. Disponível em: <<http://www.actavetscand.com/content/54/1/30>>. Acesso em: 20 out. 2015.

BARRET, D. M. W.; BARTLEWSKI, P. M.; BATISTA-ARTEAGA, M.; SYMINGTON, A.; RAWLINGS, N. C. Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to a single dose of 500 IU of eCG following a 12-day treatment with progestogen-releasing intravaginal sponges in the breeding and nonbreeding seasons in ewes. **Theriogenology**, v. 61, p. 311-327, 2004.

BARRET, D. M. W.; BARTLEWSKI, P. M.; DUGGAVATHI, R.; DAVIES, K. L.; HUCHKOWSKY, S. L.; EPP, T.; RAWLINGS, N. C. Synchronization of follicular wave emergence in the seasonally anestrous ewe: the effects of estradiol with or without medroxyprogesterone acetate. **Theriogenology**, v. 69, n. 7, p. 827-836, 2008.

BARTLEWSKI, P. M.; BEARD, A. P.; COOK, S. J.; CHANDOLIA, R. K.; HONORAMOOZ, A.; RAWLINGS, N. C. Ovarian antral follicular dynamics and their relationship with endocrine variables throughout oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 115, p. 11-124, 1999.

BARTLEWSKI, P. M.; ALEXANDER, B. D.; KING, W. A. Ovarian and endocrine determinants of superovulatory responses in anestrous ewes. **Small Ruminant Research**, v. 75, p. 210-216, 2008.

BARTLEWSKI, P. M.; BABY, T. E.; GIFFIN, J. L. Reproductive cycles in sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 3-4, p. 259-268, 2011.

BARUSELLI, P. S. **Sincronização da ovulação com GnRH e prostaglandina F2 α para inseminação artificial em tempo fixo em bubalinos**. 2001. 99 f. Tese (livre-docência em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

BARUSELLI, P. S.; GIMENES, L. U.; SALES, J. N. S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 205-211, 2007.

BARUSELLI, P. S.; MUCCIOLO, R. G.; VISINTIN, J. A.; VIANA, W. G.; ARRUDA, R. P.; MADUREIRA, E. H.; OLIVEIRA, C. A.; MOLERO-FILHO, J. R. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 47, n.8, p. 1531-1547, 1997.

BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; MARQUES, M. O.; NASSR, L. F.; BÓ, G. A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 479-486, 2004.

BERGFELT, D. R.; KULICK, L. J.; KOT, K.; GINTHER, O. J. Follicular and hormonal response to experimental suppression of FSH during follicle deviation in cattle. **Theriogenology**, v. 54, p. 1191-1206, 2000.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 22 mai. 2012.

BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

BURKE, C. R.; MUSSARD, M. L.; GASSER, C. L.; GRUM, D. E.; DAY, M. L. Estradiol benzoate delays new follicular wave emergence in a dose-dependent manner after ablation of the dominant ovarian in cattle. **Theriogenology**, v. 60, n. 4, p. 647-658, 2003.

CARVALHO, J. B. P. **Sincronização da ovulação com dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR®) em novilhas *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus* e *Bos taurus***. 2004. 122 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

CARVALHO, N. A. T.; SOARES, J. G.; PORTO FILHO, R. M.; GIMENES, L. U.; SOUZA, D. C.; NICHII, M.; SALES, J. S.; BARUSELLI, P. S. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a timed artificial insemination protocol in buffalo during the nonbreeding season. **Theriogenology**, n. 79, n. 3, p. 423-428, 2013.

CORAH, L. R.; QUEALY, A. P.; DUNN, T. G.; KALTENBACH, C. C. Prepartum and postpartum levels of progesterone and estradiol in beef heifers fed two levels of energy. **Journal of Animal Science**, v. 39, n. 2, p. 577-583, 1974.

DIAS, L. M. K. **Efeito da administração de hCG para indução de ovulação e estudo da dinâmica folicular no protocolo de 9 dias de sincronização de estros em ovelha Santa Inês**. 2011. 96 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

DIAS, L. M. K.; BARROS, M. B. P.; VIAU, P.; SALES, J. N. S.; VALENTIM, R.; SANTOS, F. F.; CUNHA JR, M. C.; MARINO, C. T.; OLIVEIRA, C. A. Effect of a new device for sustained progesterone release on the progesterone concentration, ovarian follicular diameter, time of ovulation and pregnancy rate of ewes. **Animal Reproduction Science**, v. 155, p. 56-63, 2015.

EL-BATTAWY, K. A.; SOUSA, N. M. SZENCI, O.; BECKERS, J. F. Pregnancy-associated glycoprotein profile during the first trimester of pregnancy in Egyptian buffalo cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. 2, p. 161-166, 2009.

ELMES, M.; GREEN, L. R.; POORE, K.; NEWMAN, J.; BURRAGE, D.; ABAYASEKARA, D. R. E.; CHENG, Z.; HANSON, M. A.; WATHES, D. C. Raised dietary n-6 polyunsaturated fatty acid intake increases 2-series prostaglandin production during labour in the ewe. **The Journal of Physiology**, v. 592, v. 2, p. 583-592, 2005.

FERRAZ, M. L. **Efeitos do intervalo entre aspirações foliculares e do tratamento com somatotropina bovina recombinante na população folicular e na produção *in vitro* de embriões bubalinos**. 2008. 130 f. Dissertação (mestrado em reprodução animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

FERNANDES, R. M. T.; EBERLIN, M. N.; MEURER, E. C.; PERECIN, F.; GOMES, G. C.; MIGUEZ, P. H. P.; COSTA, J. L.; AMARAL, P. H.; MARTINS-JÚNIOR, H. A.; FURTADO, P. V.; FERREIRA, C. R.; PIMENTEL, J. R. V.; SIMAS, R. C.; PORCIÚNCULA, P. M.; MADUREIRA, E. H.; PORCARI, A. M. LC-MS quantification of plasma progesterone in cattle. **Theriogenology**, v. 76, n. 7, p. 1266-1274, 2011.

FILHO, R. M. P. **Sincronização da ovulação para a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) durante a estação reprodutiva desfavorável em fêmeas bubalinas**. 2004. 99 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

FORDE, N.; BELTMAN, M. E.; LONERGAN, P.; DISKIN, M.; ROCHE, J. F.; CROWE, M. A. Oestrous cycles in Bos Taurus cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 3-4, p. 163-169, 2011.

FURTADO, P. V. **Perfil analítico de estrógenos e progestinas em diferentes matrizes biológicas na espécie ovina (*Ovis aries*)**. 2007. 96 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

GENESE. **Gen News: Informativo Genese**, n. 1, 2010.

GIL, E. S.; KUBOTA, L. T.; YAMAMOTO, Y. I. Alguns aspectos de imunoensaios aplicados à química analítica. **Química Nova**, v. 22, n. 6, p. 874-881, 1999.

GINTHER, O. J.; SILVA, L. A.; ARAUJO, R. R.; BEG, M. A. Temporal associations among pulse of 13,14-dihydro-15-keto-PGF_{2α}, luteal blood flow, and luteolysis in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 76, n. 3, p. 506-513, 2007.

GOPICHANDRAN, N.; EKBOTE, U. V.; WALKER, J. J.; BROOKE, D.; ORSIM N. M. Multiplex determination of murine seminal fluid cytokine profiles. **Reproduction**, v. 131, p. 613-621, 2006.

HADEF, A.; MIROUD, K.; KAIDI, R. Effects of body condition and anaemia status on postpartum ovarian activity in ewes under two management systems in Algeria. **Livestock Research for Rural Development**, v. 26, n. 12, p. 219, 2014.

HAFEZ, E. S. E. Hormônios, fatores de crescimento e reprodução. In: _____. **Reprodução Animal**. 6. ed. São Paulo: Manole, p.59-94, 1995.

JOHANNSON, A. In: **Principles and Practice of Immunoassay**. New York: Eds Macmillan, 1991. 300p.

KAFI, M.; MCGOWAN, M. R. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 48, n. 2-4, p. 137-157, 1997.

KAMBOJ, M.; PRAKASH, B. S. Relationship of progesterone in plasma and whole milk of buffaloes during cyclicity and early pregnancy. **Tropical Animal Health and Production**, v. 25, n. 3, p. 185-192, 1993

KANAI, Y.; SHIMIZU, H. Plasma concentrations of LH, progesterone and oestradiol during the oestrous cycle in swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Journals of Reproduction and Fertility**, v. 70, n. 2, p. 507-510, 1984.

KANUYA, N.; CALLESEN H.; HYTTEL P.; ASSEY, R.; GREVE, T. Superovulatory response of dairy cattle (*Bos Taurus*) in a tropical environment. **Theriogenology**, v. 47, n. 8, p. 1583-1593, 1997.

KARLSSON, I.; HAGMAN, R.; JOHANNISSON, A.; WANG, L.; KARLSTAM, E.; WERNERSSON, S. Cytokines as immunological markers for systemic inflammation in dogs with pyometra. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 6, p. 337-341, 2012.

KNICKERBOCKER J. J.; THATCHER, W. W.; BAZERT, F. W.; DROST, M.; BARRON, D. H.; FINCHER, K. B.; ROBERTS, R. M. Proteins secreted by day-16 to -18 bovine conceptuses extended corpus luteum function in cows. **Journal of Reproduction & Fertility**, n. 77, p. 381-391, 1986.

KOJIMA, N.; STUMPF, T. T.; CUPP, A. S.; WERTH, L. A.; ROBERSON, M. S.; WOLFE, M. W.; KITTOCK, R. J.; KINDER, J. E. Exogenous progesterone and progestins as used in estrous synchrony regimens do not mimic the corpus luteum in regulation of luteinizing hormone and 17 β -estradiol in circulation of cows. **Biology of Reproduction**, v. 47, n. 6, p. 1009-1017, 1992.

KULICK, L. J.; KOT, K.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, O. J.; Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. **Theriogenology**, v. 52, n. 5, p. 913-921, 1999.

KUMAR, L.; PANDA, R. P.; HYDER, I.; YADAV, V. P.; SASTRY, K. V. H.; SHARMA, G. T.; MAHAPATRA, R. K.; BAG, S.; BHURE, S. K.; DAS, G. K.; MITRA, S.; SARKAR, M. Expression of leptin and its receptor in corpus luteum during estrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Animal Reproduction Science**, v. 135, n. 1-4, p. 8-17, 2012.

LETELIER, C. A.; CONTRERAS-SOLIS, I.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, R. A.; ARIZNAVARRETA, C.; TRESGUERRES, J. A. F.; FLORES, J. M.; GONZALES-BULNES, A. Ovarian follicular dynamics and plasma steroid concentrations are not significantly different in ewes given intravaginal sponges containing either 20 or 40 mg of fluorogestone acetate. **Theriogenology**, v. 71, n. 4, p. 676-682, 2009.

LEYVA, V.; BUCKRELL, B. C.; WALTON, J. S. Regulation of follicular activity and ovulation in ewes by exogenous progestogen. **Theriogenology**, v. 50, n. 3, p. 395-419, 1998.

LI, D. R.; QIN, G. S.; WEI, Y. M.; LU, F. H.; HUANG, Q. S.; JIANG, H. S.; SHI, D. S.; SHI, Z. D. Immunization against inhibin enhances follicular development, oocyte maturation and superovulatory response in water buffaloes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n. 6, p. 788-797, 2011.

LIMA, H. L. S. **Avaliação do perfil de progesterona plasmática em ovinos por quimioluminescência durante a gestação**. 2012. 40 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2012.

LIMA, F. P. C.; MARQUES JR, A. P.; DOUGLAS, R. H.; HOURI NETO, M. Concentração sérica de progesterona em bezerras da raça Nelore e mestiças tratadas com progesterona em veículo de liberação lenta. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 3, p. 200-204, 2007.

LITWACK, G.; SCHMIDT, T. J. Bioquímica de hormônios II: hormônios esteróides. In: DEVLIN, T. M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. São Paulo: Edgard Bliicher, 1998. p. 747-755.

LOUREIRO, M. F. P. **Indução do estro por implante de melatonina em ovinos da raça Suffolk**. 2003. 68 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MARTINS, A. C.; MOLLO, M. R.; BASTOS, M. R.; GUARDIEIRO, M. M.; SARTORI, R. Concentrações séricas hormonais em vacas azebuadas submetidas à baixa e alta ingestão alimentar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 2, p. 243-247, 2008.

MILLIPLEX LUMINEX MEETING. 2013, Barueri.

MILLIPORE. Steroid/thyroid hormone magnetic bead panel. 2013.

NORMAN, A. W.; LITWACK, G. Steroid hormones: chemistry, biosynthesis, and metabolism. In:_____. **Hormones**. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 1997. 558 p.

NUNES, C. G. V.; COSTA, E. P.; OLIVEIRA, R. F. M.; DONXELE, J. L.; NUNES, R. V.; CARVALHO, G. R. Efeito do acondicionamento térmico ambiental sobre o desempenho reprodutivo da fêmea suína. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 4, p. 854-863, 2003.

PERERA, B. M. A. O. Reproductive cycles of buffalo. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 3-4, p. 194-199, 2011.

PINNA, A. E.; BRANDÃO, F. Z.; CAVALCANTI, A. S.; BORGES, A. M.; SOUZA, J. M. G.; FONSECA, J. F. Reproductive parameters of Santa Inês ewes submitted to short-term treatment with re-used progesterone devices. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 2, p. 333-340, 2012.

RASMUSSEN, F. E.; WILTBANK, M. C.; CHRISTENSEN, J. O.; GRUMMER, R. R. Effects of fenprostalene and estradiol-17 β benzoate on parturition and retained placenta in dairy cows and heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 2, p. 227-234, 1996.

RATHBONE, M. J.; KINDER, J. E.; FIKE, K.; KOJIMA, F.; CLOPTON, D.; OGLE, C. R.; BUNT, C. R. Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system design for the control of the estrous cycle in cattle. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 50, n. 3, p. 277-320, 2001.

RAWLINGS, N. C.; JEFFCOATE, I. A.; RIEGER, D. L. The influence of estradiol-17 β and progesterone on peripheral serum concentrations of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in ovariectomized ewe. **Theriogenology**, v.22. n. 5, p. 473-488, 1984.

REDMOND, J. S.; MACEDO, G. G.; VELEZ, I. C.; CARATY, A.; WILLIAMS, G. L. Kisspeptin activates the hypothalamic-adenohypophyseal-gonadal axis in prepubertal ewe lambs. **Reproduction**, v. 141, n. 4, p. 541-548, 2011.

RIGOLON, L. P.; PRADO, I. N.; CAVALIERI, F. L. B.; NEGRÃO, J. A.; SILVA, R. R.; MARQUES, J. A. Níveis de ingestão de matéria seca sobre metabólitos e hormônios circulantes e hormônios foliculares em novilhas de corte. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. 2, p. 367-383, 2008.

ROTA, A.; VERONESI, M. C.; VOLPE, S.; RICCARDI, A.; BATTOCCHIO, M. Estradiol-17 β , progesterone and testosterone plasma concentrations during estrus in the bitch. **Veterinary Research Communications**, n. 31, p. 197-199, 2007. Supplement 1.

ROTH, Z.; BIRAN, D. LAVON, Y. DAFNI, I.; YAKOBI, S.; BRAW-TAL, R. Endocrine milieu and developmental dynamics of ovarian cysts and persistent follicles in postpartum dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 4, p. 1729-1737, 2012.

ROY, K. S.; PRAKASH, B. S. Plasma progesterone, oestradiol-17 β and total oestrogen profiles in relation to oestrous behavior during induced ovulation in Murrah buffalo heifers. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 93, n. 4, p. 486-495, 2009.

RUBIANES, R.; UNGERFELD, R. Uterine involution and ovarian changes during early post-partum in autumn-lambing corriedale ewes. **Theriogenology**, v. 40, n. 2, p. 365-372, 1993.

RUBIANES, E.; UNGERFELD, R.; VIÑALES C.; RIVERO, A.; ADAMS, G. P. Ovarian response to gonadotropin treatment initiated relative to wave emergence in ultrasonographically monitored ewes. **Theriogenology**, v. 47, n. 8, p. 1479-1488, 1996.

SANGSRITAVONG, S.; COMBS, D. K.; SARTORI, R.; ARMENTANO, L. E.; WILTBANK, M. C. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 β in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 11, 2002.

SALLES, J. N. S. **Efeito da dieta com alta energia nos parâmetros metabólicos, endócrinos e reprodutivos de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus***. 2010. 161 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

SANTIAGO, L. L.; TORRES, C. A. A.; URIBE-VELÁSQUEZ, L. F.; CECÓN, P. R.; NOGUEIRA, E. T. Perfil hormonal de progesterona durante o ciclo estral em novilhas Nelore confinadas com diferentes ondas de crescimento folicular. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 6, p. 2017-2020, 2001. Supplement.

SANTOS, F. C. C.; BARCELOS, R. A. D. Eficiência de protocolos de sincronização de estro em ovelhas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n. 3, p. 202-205, 2012.

SARTORI, R.; HAUGHIAN, J. M.; SHAVER, R. D.; ROSA, G. J. M.; WILTBANK, M. C. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of holstein heifers and lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 905-920, 2004.

SASA, A.; TESTON, D. C.; RODRIGUES, P. A.; COELHO, L. A.; SCHALCH, E. Concentrações plasmáticas de progesterona em borregas lanadas e deslanadas no período de abril a novembro, no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 3, p. 1150-1156, 2002.

SEEKALLU, S. V.; BARRET, D. M. W.; TOOSE, B. M.; CLARKE, K.; EWEN, K. A.; DUGGAVATHI, R.; DAVIES, K. L.; PAYYULLO, K. M.; BAGU, E. T.; RAWLINGS, N. C. Pulsatile LH secretion and ovarian follicular wave emergence and growth in anestrus ewe. **Theriogenology**, v. 74, p. 912-921, 2010.

SEJIAN, V.; MAURYA, V. P.; NAQVI, S. M. K. Effect of thermal stress, restricted feeding and combined stresses (thermal stress and restricted feeding) on growth and plasma reproductive hormone levels of Malpura ewes under semi-arid tropical environment. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 95, n. 2, p. 252-258, 2011.

SENGER, P. L. **Pathways to pregnancy and parturition**. 2.ed. Pullman, USA: Current Conceptions Inc., 2005. 373 p.

SHAHAM-ALBALANCY, A.; FOLMAN, Y.; KAIM, M.; ROSENBERG, M.; WOLFENSON, D. Delayed effect of low progesterone concentrations on bovine uterine PGF2 α secretion in the subsequent oestrous cycle. **Reproduction**, v. 122, n. 4, p. 643-648, 2001.

SHAMAN-ALBALANCY, A.; ROSENBERG, M.; FOLMAN, Y.; GRABER, Y.; MEIDAN, R.; WOLFENSON, D. Two Methods of inducing low plasma progesterone concentrations have different effects on dominant follicles in cows. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 12, p. 2771-2778, 2000.

SHAMOUN, A. I.; ALNIMER, M. A. Effect of different hormonal treatments for synchronizing estrus on fertility of lactating dairy cows. **Jordan Journal of Agricultural Sciences**, v. 7, n. 4, p. 667-681, 2011.

SHRESTHA, H. K.; BEG, M. A.; IMAM, S.; GINTHER, O. J. Luteal blood flow and concentrations of circulating progesterone and other hormones associated with a simulated pulse of 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F2 α in heifers. **Reproduction**, v. 139, n. 3, p. 673-683, 2010.

SILVA, C. A. **Estudos fundamentais e aplicações envolvendo hormônios esteróides por meio de eletroforese capilar**. 2007. 171 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

SIMPLÍCIO, A. A.; FREITAS, V. J. F.; FONSECA, J. F. Biotécnicas da reprodução como técnicas de manejo reprodutivo em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 234-246, 2007.

SING, A. K.; JIANG, Y.; WHITE, T.; SPASSOVA, D. Validation of nonradioactive chemiluminescent immunoassay methods for the analysis of thyroxine and cortisol in blood samples obtained from dogs, cats and horses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 9, p. 261-288, 1977.

SIQUEIRA, A. P.; OLIVEIRA, R. M. P.; SILVA FILHO, J. M.; PALHARES, M. S.; FONSECA, J. F.; BRUSCHI, J. H.; CRUSCHI, M. C. M. Progesterona plasmática e fertilidade de fêmeas caprinas submetidas à sincronização do estro com prostaglandina F2 α . **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 2, p. 305-310, 2012.

SOUZA, M. I. L.; URIBE-VELÁSQUEZ, L. L.; OBA, E.; SÁ FILHO, O. G.; RAMOS, O. A. Secreção de esteróides ovarianos, em ovelhas mestiças de raças exploradas para corte, em distintos momentos reprodutivos, no Estado de São Paulo. **Ciência Animal Brasileira**, v. 64, n. 2, p. 305-310, 2008.

SOUZA, R. H. F. A. **Avaliação sérica de estrógeno e progesterona por método de imunoensaio multianalito em cadelas durante o ciclo estral**. 2015. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

STUBBINGS, R. W.; WALTON, J. S. Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in Holstein cows. **Theriogenology**, v. 43, n. 4, p. 705-712, 1995.

TAHIR, M. Z.; THOUMIRE, S.; RAFFAELLI, M.; GRIMARD, B.; REYNAUD, K.; CHASTAND-MAILLARD, S. Effect of blood handling conditions on progesterone assay results obtained by chemiluminescence in the bitch. **Domestic Animal Endocrinology**, v.45, p.141-144, 2013.

THOREL, J. I.; LARSON, S. M. **Radioimmunoassay and related techniques**. Saint Louis: Mosby Company, 1978. 289 p.

TURZILLO, A. M.; FORTUNE, J. E. Suppression of the secondary FSH surge with bovine follicular fluid is associated with delayed ovarian follicular development in heifers. **Journals of Reproduction & Fertility**, v. 89, n. 2, p. 643-653, 1990.

VIGNALI, D. A. A. Multiplexed particle-based flow cytometric assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 243, p.243-255, 2000.

VOLKMANN, D. H. The effects of storage time and temperature and anticoagulant on laboratory measurements of canine blood progesterone concentration. **Theriogenology**, v.66, p.1583-1586. 2006.

WARRIACH, H. M.; MCGILL, D. M.; BUSH, R. D.; WYNN, P. C.; CHOCHAN, K. R. A review of recent developments in Buffalo Reproduction – A review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 29, n. 3, p. 451-455, 2015.

WERVEN T. V.; WALDECK, F.; SOUZA, A. H.; FLOCH, S. ENGLEBIENNE, M. Comparison of two intravaginal progesterone releasing devices (PRID-Delta vs CIDR) in dairy cows: Blood progesterone profile and field fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 138, n. 3-4, p. 143-149, 2013.

WILTBANK, M.; LOPES, H.; SARTORI, R.; SANGSRITAVONG, S.; GÜMEN, A. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. **Theriogenology**, n. 65, n. 1, p.17-19, 2006.

WISCHRAL, A.; VERRESCHI, I. T. N.; LIMA, S. B.; HAYASHI, L. F.; BARNABE, R. C. Pre-parturition profile of steroids and prostaglandin in cows with or without foetal membrane retention. **Animal Reproduction Science**, v. 67, n. 3-4, p. 181-188, 2001.

WOLFENSON, D.; INBAR, G.; ROTH, Z.; KAIM, M.; BLOCH, A.; BRAW-TAL, R. Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. **Theriogenology**, n. 62, n. 6, p. 1042-1055, 2004.