

CARLOS ANTONIO CARDOSO

**UTILIZAÇÃO DA QUIMIOLUMINESCÊNCIA NA DETERMINAÇÃO
DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE PROGESTERONA,
HORMÔNIOS LUTEINIZANTE E FOLÍCULO ESTIMULANTE EM
NOVILHAS HOLANDESAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

C268u
2018
Cardoso, Carlos Antônio, 1953-
Utilização da quimioluminescência na determinação das
concentrações séricas de progesterona, hormônios luteinizante e
folículo estimulante em novilhas holandesas / Carlos Antônio
Cardoso. – Viçosa, MG, 2018.
vii, 96 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Virginia Ramos Pizziolo.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Bovinos de leite. 2. Estro. 3. Bovinos - Reprodução -
Aspectos endócrinos. 4. Progesterona. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. II. Título.

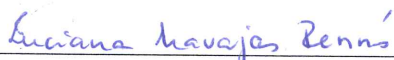
CDD 22. ed. 636.2142

CARLOS ANTONIO CARDOSO

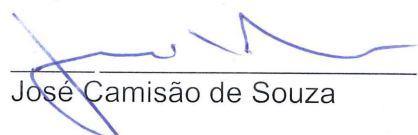
**UTILIZAÇÃO DA QUIMIOLUMINESCÊNCIA NA DETERMINAÇÃO
DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE PROGESTERONA,
HORMÔNIOS LUTEINIZANTE E FOLÍCULO ESTIMULANTE EM
NOVILHAS HOLANDESAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 29 de junho de 2018.



Luciana Navajas Rennó
(Coorientadora)



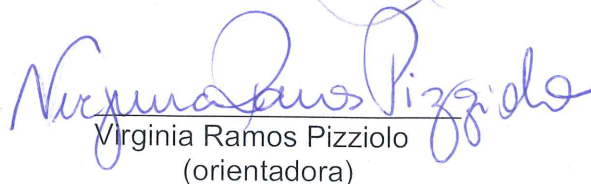
José Camisão de Souza



Tássia Louregianni Carvalho Pinto



Marcos Brandão Dias Ferreira



Virginia Ramos Pizziolo
(orientadora)

Aos meus queridos e amados filhos **Bernardo, Carolina, Luciana, Sophia e Raphaela**, e também aos amigos **Maria de Lourdes, Marcos e Antônio Ribeiro**, pela força, compreensão e paciência, na superação das dificuldades.

Aos meus pais **Jair e Helena** e aos meus irmãos **Geraldo, Lídia, Myriam, Marília e Hércio**, amados sobrinhos **Fernanda, Gabriela, Flávia, Rafael e Victor**, pela confiança e apoio.

A todos os meus inúmeros amigos e colegas que tanto torceram por mim.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me conduzir por todos esses anos, me mantendo no caminho da retidão e da correção, com o objetivo de sempre fazer o bem.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela excelência de ensino e toda a estrutura básica para a realização do trabalho.

Ao laboratório de Fisiologia da Reprodução Animal, Departamento de Zootecnia da UFV pelos equipamentos utilizados durante a realização das análises.

A CAPES pelo apoio financeiro.

À incansável orientadora Virginia Ramos Pizziolo por ter acreditado, apoiado e orientado tão prontamente.

À grande coorientadora e amiga Professora Luciana Navajas Rennó, pelo incentivo, apoio, confiança que foram prestados durante todo o período de curso.

Ao grande amigo e construtor de todo este trabalho Professor José Camisão de Souza pela ajuda imensurável.

À Tássia, Cláudio Mafra, Tânia Toledo e ao Eduardo pela efetiva participação e por toda a boa vontade e apoio incondicional.

Aos funcionários do laboratório de Fisiologia da reprodução animal, principalmente ao Sr. Mário, pela companhia e apoio.

Aos amigos da ScanLab Diagnóstica, Beckman Coulter e Sarsted pelo auxílio na cessão dos suprimentos, principalmente ao Antonio Carlos Ribeiro, Leandro Ribeiro e Sandra Castro.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. Introdução Geral	01
2. Revisão de Literatura	02
2.1. Ciclo Estral	02
2.1.1. Características (Dinâmica)	02
2.1.2. Foliculogênese (etapas)	03
2.1.3. Ondas Foliculares	05
2.1.4. Ovulação	06
2.1.5. Corpo lúteo	07
2.1.6. Perfil Hormonal	08
2.1.6.1. Progesterona (P4)	10
2.1.6.2. Hormônio luteinizante (LH).....	11
2.1.6.3. Hormônio folículo estimulante (FSH)	12
3. Métodos utilizados em dosagens hormonais	13
3.1. Considerações gerais	13
3.2. Aspectos imunológicos dos ensaios	15
3.3. Metodologias utilizadas na avaliação hormonal	18
3.3.1. Aspectos gerais	18
3.3.2. Rádio Imuno Ensaio (RIA)	18
3.3.3. Métodos imunoenzimáticos (IA)	20
3.3.3.1. Características gerais	20
3.3.3.2. A escolha do método	21
3.3.3.3. ELISA	23
3.3.3.4. A quimioluminescência	24
3.3.3.5. Outras aplicações da quimioluminescência	29
3.3.4. Validação	30
3.3.5. Futuro da quimioluminescência em MV/Zootec	31
4. Referências bibliográficas	34
5. Objetivos	45
5.1. Objetivo geral	45
5.2. Objetivos específicos	45
5.2.1. Objetivos específicos P4	45
5.2.2. Objetivos específicos LH	45
5.2.3. Objetivos específicos FSH	45

<i>Capítulo I: Use of Chemiluminescence to determine the concentrations of serum progesterone in bovines (Utilização da quimioluminescência para determinar as concentrações séricas de progesterona em bovinos)</i>	46
ABSTRACT	46
RESUMO	47
INTRODUCTION	48
MATERIAL AND METHODS	50
RESULTS AND DISCUSSION	53
CONCLUSION	60
REFERENCES	61
Capítulo II: Use of chemiluminescence to determine luteinizing (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) concentrations in bovine serum	64
ABSTRACT	64
RESUMO	65
INTRODUCTION	66
MATERIAL AND METHODS	68
RESULTS AND DISCUSSION	71
CONCLUSION	84
REFERENCES	85
6. Anexos	89
Tabela 1: valores de referência quimioluminescência	89
Tabela 2: curva de calibração de Progesterona	89
Tabela 3: curva de calibração de	89
Tabela 4: curva de calibração de	89
Figura 01: Gráfico animal 3043 FSH x P4	90
Figura 02: Gráfico animal 3045 FSH x P4	90
Figura 03: Gráfico 4004 FSH x P4.....	91
Tabela 05: CL x P4 x FSH x LH 3019.....	91
Tabela 06: CL x P4 x FSH x LH 3029.....	92
Tabela 07: CL x P4 x FSH x LH 3036	92
Tabela 08: CL x P4 x FSH x LH 3039	93
Tabela 09: CL x P4 x FSH x LH 3037.....	93
Tabela 10: CL x P4 x FSH x LH 3042	94
Tabela 11: CL x P4 x FSH x LH 3043	95
Tabela 12: CL x P4 x FSH x LH 3045	96

RESUMO

CARDOSO, Carlos Antônio, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2018. **Utilização da quimioluminescência na determinação das concentrações séricas de progesterona, hormônios luteinizante e folículo estimulante em novilhas holandesas.** Orientadora: Virginia Ramos Pizzolo. Coorientadora: Luciana Navajas Rennó.

O conhecimento das condições reprodutivas dos bovinos é fundamental para a manutenção da eficiência reprodutiva dos rebanhos. O estudo do perfil hormonal reprodutivo é essencial na avaliação de cada matriz. Os métodos de dosagens atuais, ensaios enzimáticos (ELISA) e radioimunoensaio (RIA) são de alto custo e pouco viáveis para a utilização diagnóstica em larga escala em rebanhos comerciais. O objetivo foi utilizar a quimioluminescência como método analítico para avaliar as concentrações séricas de progesterona (P4), hormônios luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH) durante um período aleatório (18 a 45 dias) em novilhas holandesas (n=9) cíclicas e estabelecer ligações com funções reprodutivas. Amostras diárias de sangue, foram coletadas e armazenadas para determinação hormonal por quimioluminescência. O diâmetro do corpo lúteo (CL) foi mensurado por ultrassonografia transretal. Os dados de concentrações hormonais foram avaliados como medidas repetidas, sendo considerado o efeito fixo de dia de coleta pelo procedimento GLIMMIX do SAS®. As concentrações de P4 foram correlacionadas com o diâmetro do CL utilizando o procedimento REG do SAS®. Houve correlação positiva entre o diâmetro do CL e a concentração de P4 ($r^2=0,22$ $P<0,0001$). Os padrões das concentrações de P4, LH e FSH ao longo do período avaliado retrataram o perfil do ciclo estral de forma semelhante aqueles reportados na literatura com o uso de RIA e ELISA. No teste de imprecisão foram observados coeficientes de variação de intra-ensaio de 4,5%, 4,6% e 5,4% para P4, LH e FSH, respectivamente. Os resultados obtidos com a quimioluminescência foram condizentes com aqueles de RIE e de ELISA e foram capazes de determinar a ocorrência de ciclos estrais, assim como de avaliar a funcionalidade ovariana. Mais estudos utilizando essa metodologia deverão ser realizados para a utilização dessa metodologia como alternativa em laboratórios de dosagens hormonais de bovinos.

ABSTRACT

CARDOSO, Carlos Antonio, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2018. **Use of Chemiluminescence in the determination of circulating concentrations of progesterone, luteinizing hormones and follicle stimulating hormone in heifers Holstein.** Advisor: Virginia Ramos Pizziolo. Co-advisor: Luciana Navajas Rennó.

The knowledge of the reproductive conditions of cattle is fundamental for the maintenance of the herd reproductive efficiency. The dosage of reproductive hormones is essential in assessing the real situation of each matrix. However, the current dosage methods of enzyme-linked immunosorbent assay or ELISA and radioimmunoassay (RIA) are expensive and unviable for large-scale diagnostic use in commercial herds. The objective was to use chemiluminescence as an analytical method to characterize the serum concentrations of progesterone (P4), luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) during a random period (18 to 45 days) in cyclic Holstein heifers (n = 9) and establish links with reproductive functions. Daily blood samples from the caudal vein were collected and the serum stored for analysis using chemiluminescence. The diameter of the corpus luteum (CL) was measured by transrectal ultrasonography on the days of blood sample collection. The hormone concentration data were evaluated as repeated measures, considering the fixed effect of day of collection by the SAS® GLIMMIX procedure. P4 concentrations were correlated with CL diameter using the SAS® REG procedure. There was a positive correlation between the CL diameter and the P4 concentration ($r^2 = 0.22$, $P < 0.0001$). The patterns of P4, LH and FSH concentrations throughout the assessed period similarly portrayed those reported in the literature with the use of RIE and ELISA. In the imprecision test, intra-assay coefficients of 4.5%, 4.6% and 5.4% were observed for P4, LH and FSH, respectively. The results obtained with chemiluminescence were consistent with those of RIE and ELISA and were able to determine the occurrence of estrous cycles, as well as, assess ovarian functionality. Further studies using this methodology should be performed to use it as an alternative in laboratories of bovine hormonal dosages.

1. Introdução Geral

Devido a grande importância econômica do rebanho bovino brasileiro, que possui mais de 218 milhões de animais, perdendo apenas para a Índia com mais de 300 milhões de animais e ainda uma produção de leite de 5,87 bilhões de litros e abates para produção de carne de 7,37 milhões de cabeças (IBGE, 2016) a eficiência reprodutiva deve manter-se em patamares elevados. Para o acompanhamento do rebanho durante a fase reprodutiva, faz-se necessário a adoção de metodologias alternativas para a avaliação do perfil hormonal. O conhecimento mais detalhado das concentrações hormonais é ainda um desafio a ser atingido com o objetivo de diagnosticar a saúde reprodutiva de um indivíduo.

A reprodução é uma seqüência de eventos que se iniciam com o desenvolvimento do sistema reprodutivo do embrião que, após o nascimento precisa crescer e alcançar a puberdade para adquirir a habilidade de produzir gametas férteis (Senger, 2005).

A manutenção da eficiência reprodutiva é indispensável dentro de um rebanho para garantir a produtividade e, dentro deste contexto, eleva-se a demanda por pesquisas na área da reprodução assistida, sendo a caracterização das diferentes fases do ciclo estral condição básica para a aplicação das biotécnicas. Compreender os fenômenos fisiológicos é de extrema importância para aprimorar as biotecnologias reprodutivas e, por consequência, a eficiência reprodutiva (Lima, 2012; Baruselli et al., 2007; Simplício et al., 2007).

O manejo reprodutivo é, sem dúvida, um dos segmentos mais importantes na produção animal, pois reflete diretamente nos índices de produtividade dos rebanhos, sendo um dos principais enfoques na bovinocultura. Ao se observar a ineficiência na maioria dos sistemas de produção, deve-se dar atenção diferenciada à identificação do estro e da repetição do cio, principalmente das vacas primíparas, visto que isto representa um ponto de estrangulamento no sistema produtivo (Baruselli et al., 2007), o acompanhamento da vida hormonal reprodutiva, utilizando metodologias de fácil execução, permitiria melhor acompanhamento da funcionalidade desses animais.

2. Revisão de Literatura

2.1. O ciclo estral

2.1.1. Características (Dinâmica)

Após a puberdade, a fêmea bovina, entra no período de ciclicidade, exibindo então comportamento de estro a cada 21 dias aproximadamente, até que a gestação tenha se estabelecido com sucesso. Este é o período denominado de estro ou ciclo estral (Barros et al., 1995).

A duração do ciclo estral de bovinos varia de acordo com a raça, maturidade e até mesmo individualmente (Robinson e Shelton, 1991). Genericamente o estro de zebuínos é mais curto e mais discreto que de taurinos, e o intervalo entre o estro e a ovulação é maior (Hunter e Wilmut, 1984; Hansel e Convey, 1983; Wishart, 1972).

O estro de bovinos é caracterizado pela receptividade sexual, quando fêmea permite ser montada (Blockey, 1980; Esslemont et al., 1980), pela presença do muco vaginal claro, edema vulvar, micção frequente e inquietação (Hafez, 2004).

Em *Bos taurus taurus* foi verificado que o estro dura em média 18 horas e a ovulação ocorre 10-12 horas após o seu final (Wilmut, 1984; Hansel e Convey, 1983; Hunter e; Wishart, 1972). Já em *Bos taurus indicus* a fase do estro dura em média 11 horas, com variação de 1,3 a 20 horas (Galina e Arthur, 1990) e o intervalo entre o início do estro e a ovulação é de 26,7 horas, com a maioria dos estros ocorridos à noite (Pinheiro et al., 1988).

O ciclo estral se caracteriza pela presença de quatro estágios, sendo o proestro o período que antecede ao estro, inicia-se com a luteólise, dura de 2 a 5 dias, maior transição endócrina, domínio hormonal passa a ser estrogênico, responsabilidade por esta transição dos hormônios luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH). No estro estágio de mais fácil reconhecimento o Estradiol (E2) predomina, maior receptividade sexual (Rakha et al., 1970). No metaestro, ocorre a ovulação e conseqüente formação do corpo lúteo (CL), E2 e progesterona (P4) em

baixas concentrações, fase de luteinização, início da elevação de produção de P4. No diestro, período de máxima função luteal, secreção de P4 é alta e culmina com a luteólise. A P4 modula as atividades endometriais no intuito de receber o embrião.

A fase folicular tem domínio do E2 produzido nos folículos ovarianos, que estimula mudanças nos órgãos reprodutivos e no comportamento sexual, ficando as fêmeas receptivas aos machos. Esta fase é relativamente curta, dura cerca de 20 % do total do ciclo estral, e se caracteriza também pela regressão do CL do ciclo anterior. A fase folicular se inicia com a luteólise, ocasionando redução nas concentrações séricas de P4. A fase luteínica caracteriza-se pelo domínio de P4 produzida pelas células luteais, modulando a secreção endometrial para se adequar o ambiente intrauterino à gestação (Webb et al., 2004).

2.1.2. Foliculogênese

O desenvolvimento folicular passa por diversas fases. O crescimento folicular é caracterizado por um padrão de ondas, sendo a emergência de cada onda de crescimento causada por aumento na concentração sérica do FSH. A foliculogênese é iniciada a partir do folículo primordial, que após a ativação é denominado folículo primário, que na seqüência desenvolve-se a folículo secundário, terciário até antral inicial. Com aumento significativo e contínuo do antro o folículo antral inicial chega ao estágio denominado antral que culmina no folículo pré ovulatório, também denominado dominante (Adams et al., 2008; Mihm et al., 2002; Ginther et al., 1999; Ginther et al., 1997; Gong et al., 1996; Ginther et al., 1996; Mihm et al., 1996; Sunderland et al., 1994; Adams et al., 1992a; Adams et al., 1992b; Hamilton et al., 1992).

O folículo primordial possui uma única camada de células escamosas. O folículo primário resulta da ativação do folículo primordial e de ligeiro desenvolvimento do ovócito, sendo envolvido por uma única camada de células cuboides (epiteliais). O folículo secundário é envolvido por duas camadas de células da granulosa, sendo o terciário caracterizado por pelo menos três ou mais camadas de células foliculares e uma zona pelúcida bem definida em torno do ovócito. Com

a formação do antro ou cavidade os folículos em desenvolvimento após a fase terciária são denominados de antrais iniciais. O folículo antral ou terciário possui fluido folicular dentro da cavidade antral que futuramente torna-se antral e após a seleção em folículo dominante. O folículo pré-ovulatório é denominado folículo de *Graaf*. Os folículos antrais podem ser observados macroscopicamente sendo circundado pela camada de células da teca interna, que é composta de células esteroidogênicas que irão dar suporte na produção de precursores da esteroidogênese.

O folículo que continua seu crescimento, agora chamado de dominante, torna-se dependente do LH (Ginther et al., 2001a) e suprime ou inibe o crescimento dos folículos do *pool* folicular respectivo. A secreção de FSH é inibida pelos hormônios folistatina e inibina, produzidos pelos folículos em crescimento, e, principalmente pelo E2 produzido pelo folículo dominante (FD), impedindo o crescimento dos folículos subordinados, dependentes de FSH, e o desenvolvimento de uma nova onda folicular (Adams et al., 2008; Kastelic et al., 1990).

O hipotálamo possui função primordial na modulação do ciclo estral, produzindo hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) que é o responsável pela liberação de FSH e LH. A fase folicular é controlada pelo FSH e LH e envolve crescimento e morte desses folículos. A fase folicular corresponde ao período de crescimento e de degeneração folicular. Folículos antrais de vários tamanhos e fases de desenvolvimento em resposta as secreções tônicas de FSH e LH. Os folículos antrais são classificados de acordo com o diâmetro em tamanhos, pequenos, médios e grandes (Ginther et al., 1996).

Divergência é definida como o início de mudanças diferenciais nas taxas de crescimento entre o maior e o próximo maior folículo subsequente à onda de emergência, sendo considerada como a componente chave do FD (Sartorelli et al., 2005; Ginther et al., 2001a).

O início da divergência ocorre quando o maior folículo alcança aproximadamente 8,5 mm (Ginther et al., 1998; Ginther et al., 1997). Sendo que Sartorelli et al (2005) verificaram que em vacas da raça Nelore a divergência ocorreu

quando o diâmetro alcançou 6,1 mm, ou seja, com diâmetro inferior as raças europeias.

No início da divergência apenas o folículo mais desenvolvido é capaz de utilizar baixas concentrações de FSH (Ginther et al., 2001a; Bergflet et al., 2000).

Em adição, o FD aparentemente também começa a utilizar LH como parte do estímulo gonadotrófico (Ginther et al., 1996). O LH tem efeito positivo no diâmetro do maior folículo após a divergência. Resultados indicam que o LH está envolvido na produção de E2 pelo FD e aumenta concentrações do fator de crescimento semelhante à Insulina (IGF-1) livre durante o processo de divergência (Ginther et al., 1998).

Ginther et al. (2000a) sustentam a hipótese de que o folículo dominante aumenta a secreção de E2 no sangue no início da divergência folicular e que o E2 liberado está envolvido na continuação do declínio das concentrações de FSH abaixo das exigências dos folículos menores.

O destino do FD depende do CL. Nos casos de concentrações elevadas de P4, o folículo dominante torna-se atrésico devido à influência negativa da P4 sobre a pulsatilidade da secreção de LH (Ireland et al., 2000). A aquisição da capacidade ovulatória provavelmente envolve aumento na expressão dos receptores de LH nas células da granulosa do FD (Sartori et al., 2016).

Folículos recrutados e selecionados durante estas fases se tornam atrésicos. A última onda folicular, que ocorre durante o processo de luteólise, resulta num FD que ovula (Sartori et al., 2016).

2.1.3. Ondas Foliculares

A foliculogênese em vacas é caracterizada por ondas de desenvolvimento folicular, onde cada onda corresponde ao desenvolvimento inicial da população de folículos antrais (Castillo et al., 2006).

No ciclo estral, o crescimento folicular exhibe um padrão de ondas. A emergência de cada onda de crescimento folicular é causada pelo aumento na concentração sérica de FSH, provocando o recrutamento e o crescimento folicular.

O *feedback* positivo estimula os neurônios hipotalâmicos anteriores, responsáveis pela síntese e liberação do hormônio gonadotrófico (GnRH) pré-ovulatório, sendo responsável por grandes quantidades de liberação de GnRH. Quando o E2 alcançar um limiar, com aumento da amplitude e dos pulsos de LH, há estímulos do lobo anterior hipofisário para sintetizar e liberar grandes quantidades de LH, estimulando a ovulação (Adams et al., 2008; Mihm et al., 2002; Ginther et al., 1999; Ginther et al., 1996; Gong et al., 1996; Hamilton et al., 1992;).

No ciclo estral em bovino, folículos antrais se desenvolvem em duas ou três ondas sucessivas de recrutamento folicular, com o recrutamento dos folículos, em seguida a seleção do folículo dominante, porém a ovulação ocorre somente na última onda folicular (Fortune, 1994).

No diestro, uma ou mais ondas foliculares ocorrem, porém, como não há suporte hormonal para o crescimento, os mesmos entram em processo de atresia. Este aporte hormonal não ocorre em função da elevada concentração de P4 produzida pelas células luteínicas (Senger, 2005).

Em uma onda, os folículos crescem de forma semelhante até o momento da divergência ou desvio ou ponto de divergência, no qual inicia a diferença nas taxas de crescimento dos dois maiores folículos em relação aos demais folículos que compõem o *pool* da respectiva onda folicular (Ginther et al., 1996).

2.1.4. Ovulação

Os folículos adquirem capacidade ovulatória com aproximadamente 10,0 mm, correspondendo a 1 dia depois do início da divergência folicular, mas requerem doses maiores de LH para induzir a ovulação. A aquisição da capacidade ovulatória pode envolver aumento na expressão dos receptores de LH nas células da granulosa (Sartori et al., 2016).

Altas concentrações de E2 com baixas concentrações de P4 (menor que 1,0 ng/mL) provocam o pico pré-ovulatório de LH e a consequente ovulação (Cupp et al., 1995; Sunderland et al., 1994; Stumpf et al., 1989).

A ovulação é causada pela ruptura da parede folicular provocada pelo pico pré-ovulatório de LH que ocorre junto a uma onda de FSH (Mihm et al., 2002; Cavalieri et al., 1997; Kaneko et al., 1991;).

A ovulação é induzida pelo aumento da secreção de LH, sendo caracterizado pela ruptura do folículo pré-ovulatório, expulsão do ovócito e posteriormente pela formação do CL. O *feedback* negativo para a P4 no hipotálamo é removido e o GnRH é liberado com grande amplitude e grande frequência, maiores que na fase luteínica, isto causa a liberação de FSH e LH em altas concentrações, promovendo o desenvolvimento folicular e a produção de estradiol, no final da fase folicular, redução de FSH. A regulação local da ovulação envolve a interação do LH com fatores intrafoliculares incluindo esteroides, prostaglandinas e peptídeos derivados de células endoteliais, leucócitos, fibroblastos e células esteroidogênicas (Algire, 1992; Fortune et al., 1988; Schonemann et al., 1985; Hansel e Convey, 1983).

2.1.5. Corpo Lúteo

Na ruptura folicular fisiológica, ou ovulação, do FD, vasos sanguíneos se rompem, causando hemorragia local, perda de sangue e líquido folicular, causando o colapso da parede folicular e parte da granulosa e da teca migram para o ápice do folículo formando o estigma. O corpo lúteo é a estrutura resultante do redirecionamento metabólico das células da granulosa acoplado ao fenômeno físico da ruptura dos vasos sanguíneos. Antes da formação de um corpo lúteo maduro ocorre inicialmente no metaestro a formação do corpo hemorrágico, que precede a diferenciação das células da teca interna e da granulosa em células luteínicas para formar o corpo lúteo (Senger, 2005)

No início da formação do CL, quando a concentração de P4 está baixa, até por volta de três a quatro dias após a ovulação, há um pulso de LH a cada uma ou duas horas. Conforme o CL atinge sua maturidade, o aumento da concentração de P4 causa a redução da frequência da secreção de LH, por *feedback* negativo sobre

o hipotálamo, que então é secretado com frequência de um pulso a cada três ou quatro horas (Mihm et al., 2002; Mihm et al., 1996).

Após 15-16 dias se não aconteceu a fecundação e a presença de um embrião, o útero secreta prostaglandina- $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) que causa a luteólise. Com a luteólise, a concentração sérica de P4 diminui a concentrações inferiores a 1 ng/mL, o que permite o aumento de frequência dos pulsos de LH (Karsh, 1987; Goodman e Karsh, 1980).

2.1.6. Perfil Hormonal do ciclo estral

O ciclo estral da fêmea bovina é controlado por uma complexa interação neuroendócrina coordenada pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, por mecanismo intra-ovários que estabelecem uma dinâmica folicular a qual permite o desenvolvimento de um folículo maduro capaz de ovular em momento propício e produzir assim, um gameta capaz de ser fecundado. Os neurônios do hipotálamo se comunicam com o lobo anterior da hipófise, utilizando uma modificação circulatória conhecida como sistema porta hipotalâmico-hipofisária, axônio de corpos celulares dos núcleos tônico (núcleo ventromedial, núcleo arqueado e eminência média) e pré-ovulatório (área hipotalâmica anterior, núcleo pré-optico e supraquiasmático), estendem-se no caule do hipotálamo onde o neurotransmissor (botão terminal) termina numa sofisticada e especializada rede capilar (sistema porta hipotalâmico-hipofisário) que se divide em pequenos capilares arteriais no caule hipofisário, este sistema porta é extremamente hábil para liberar pequenas quantidades de hormônios (picogramas, pg) para serem depositadas no plexo capilar (Cunningham, 2004; Clarke, 1988; Price e Webb, 1988; Goodman e Karsh, 1980) Este processo reprodutivo dos mamíferos é regulado por uma complexa, e apenas parcialmente entendida, cascata de atividades combinadas do Sistema Nervoso Central (SNC), tecidos secretórios, tecidos alvo e vários hormônios hipotalâmicos, as gonadotrofinas e os esteroides secretados pelos ovários (Hafez, 2004).

O eixo formado pelo hipotálamo, hipófise e gônadas (hipotálamico-hipofisário-gonadal), é o principal e é responsável pela liberação do GnRH, que controla a liberação de FSH e LH, hormônios hipofisários, pelas células basófilas, que agem diretamente nas gônadas (gonadotrofinas) e também E2, P4 e inibina (In), estes últimos por sua vez, agem no hipotálamo retroalimentando este eixo, por meio de *feedbacks* negativos e positivos (Cunningham, 2004; Price e Webb, 1988; Goodman e Karsh, 1980).

As células da adeno-hipófise podem ser divididas em basófilas e acidófilas. O LH e o FSH são produzidos dentro das células basófilas. Foi demonstrado que ambos podem estar no mesmo gonadotropo. Os gonadotrópicos têm receptores de GnRH acoplados à proteína G em sua membrana, e a secreção de LH e FSH durante o ciclo estral é controlada pela frequência de pulsos de GnRH. Exceto durante o surto pré-ovulatório de LH no ciclo estral, há uma clara diferença nos padrões de secreção de FSH e LH e somente o LH é liberado de uma maneira pulsátil em resposta ao GnRH (Senger, 2005).

O FD continua seu desenvolvimento, aumentando a secreção dos hormônios E2 e In, que mantém a concentração de FSH entre 0,1 e 0,4 mUI/mL (Mihm et al., 2002).

Nessas condições, os folículos subordinados passam a regredir, após a luteólise, devido ao aumento de pulsos de LH, em decorrência da redução da concentração de P4, o FD passa a crescer regularmente e a secretar quantidades maiores de E2 (Fortune et al., 1988).

Durante a maior parte do ciclo estral, ambos os hormônios E2 e P4, inibem a secreção de FSH e LH (gonadotrofinas) por meio de retroalimentação negativa sobre o hipotálamo (Cunningham, 2004; Price e Webb, 1988; Goodman e Karsh, 1980).

O E2 atua no sistema nervoso central causando a manifestação do estro. Ele estimula a síntese de receptores para GnRH na hipófise (Adams et al., 2008; Mihm et al., 2002; Ginther et al., 1999; Ginther et al., 1997; Findlay, 1994; Schonemann et al., 1985), tornando-se mais responsáveis aos estímulos do GnRH, com aumento

de E2 (Kesner et al., 1981) ao mesmo tempo que aumenta a frequência e amplitude dos pulsos de GnRH pelo hipotálamo (Hansel e Convey, 1983).

Em bovinos, próximo ao estro, o folículo pré-ovulatório cresce até um diâmetro máximo e produz quantidades elevadas de E2. Em determinado momento, o E2 circulante alcança concentração com duração suficiente para induzir o comportamento estral e o pico pré-ovulatório de LH. A ovulação ocorre entre 24 a 32 horas após o surgimento do pico hormonal (Wiltbank et al., 2002).

A P4 age durante a maior parte do ciclo (Cunningham, 2004; Price e Webb, 1988; Goodman e Karsh, 1980).

Quando os hormônios são continuamente produzidos P4 durante a prenhez, os maiores controladores da produção, são os *feedbacks* positivos e negativos, sendo o *feedback* positivo o estímulo para a produção hormonal e o *feedback* negativo à supressão da produção hormonal (GnRH).

2.1.6.1. Progesterona (P4)

Após a ovulação o CL se desenvolve produzindo concentrações elevadas de P4 que restringem a secreção de LH para pulsos de baixa frequência e amplitude que resultam na redução das concentrações de LH (Ginther et al., 2001a)

A P4 causa um forte *feedback* negativo no hipotálamo para produção de GnRH, quando sua concentração é alta, no controle da liberação de LH e FSH (Mihm et al., 2002; Mihm et al., 1996), quando então os neurônios sintetizam e secretam GnRH somente em concentrações basais, não suficientes para causar desenvolvimento, mas ele não poderá ser suficiente para a produção de altas concentrações de E2 (Mihm et al., 2002).

As concentrações plasmáticas de P4 nos bovinos apresentam variações durante o ciclo estral, e estão correlacionadas com a funcionalidade do CL, é importante reconhecer que CL durante a fase luteínica sofrendo regressão pela ação da prostaglandina, pode transformar o FD em pré-ovulatório (Adeyemo e Heath, 1980).

Após a ovulação, as células da granulosa e da teca se diferenciam (luteinização) dando origem ao CL, grande produtor de P4. Com a maturação do CL, há um aumento progressivo da concentração de P4, atingindo valores máximos entre o quinto e décimo primeiro dia do ciclo estral (Mihm et al., 1996).

As concentrações de P4 permanecem elevadas durante toda a vida funcional do CL, o que é importante para o desenvolvimento embrionário e manutenção da gestação, exercendo forte *feedback* negativo em ambos os centros hipotalâmicos (pré-ovulatório e tônico). O centro pré-ovulatório responde mais sensivelmente ao *feedback* positivo (Wiltbank, et al., 2002).

Para a utilização no diagnóstico de prenhez, há de se avaliar outras condições em que a P4 após a inseminação artificial permaneça alta, para diferenciar de condições tais como, piometra, pseudogestação, hidrometra e mumificação fetal (Barbato et al., 2009; Boscós et al., 2003).

Existem algumas limitações, que devem ser consideradas quando da mensuração da concentração de P4 como método de diagnóstico de gestação precoce. São necessários dados precisos do manejo reprodutivo dos animais (detecção de cio, data do acasalamento ou Inseminação artificial), para a interpretação correta dos resultados (Dionysus, 1991).

2.1.6.2. Hormônio luteinizante (LH)

O LH é um hormônio glicoproteico contendo 13% a 25% de carboidrato constituída por duas subunidades denominadas α e β . A subunidade α é idêntica numa espécie para esses hormônios glicoproteicos, já a subunidade β é singular para cada gonadotrofina sendo responsável pelas atividades biológicas específicas.

O LH é liberado sob a forma de pulsos que variam em frequência e amplitude refletindo a secreção de GnRH (Martin et al., 2013; Gimenes et al., 2008; Wright e Malmo, 1992; Rahe et al., 1980; Hauger et al., 1977).

O LH é liberado em forma de pulsos (Wright e Malmo, 1992; Rahe et al., 1980; Hauger et al., 1977).

Animais *Bos taurus taurus* possuem concentrações plasmáticas de LH mais elevadas do que *Bos taurus indicus*, maior onda pré-ovulatória e maior quantidade de LH hipofisário disponível para liberação (D' Occhio et al., 1990), aumento nas concentrações de P4, no dia 7 do ciclo estral e também aumento no dia 14 do ciclo estral, também maiores concentrações de E2 no pico pré-ovulatório, assim como, ligeiro aumento nas concentrações séricas de FSH (Sartori et al., 2016). Os *Bos taurus indicus* respondem mais lentamente aos estímulos de estrógenos que os *Bos taurus taurus*. Assim, zebuínos apresentam manifestação do estro em menor tempo e com menor intensidade

2.1.6.3. Hormônio folículo estimulante (FSH)

O hormônio FSH é uma glicoproteína, com a mesma constituição do LH descrita acima. Os hormônios FSH e LH são sintetizados e liberados pela hipófise e induzem ao crescimento folicular e a síntese e liberação de E2 pelas células foliculares, culminado no estro e posteriormente na ovulação no início do metaestro (Ginther et al., 1997).

Cada onda folicular é estimulada por um pequeno aumento nas concentrações séricas de FSH, e seguido pelo recrutamento de um "pool" de folículos medindo a partir de 2 mm (Ginther et al., 1997). O FSH alcança o pico quando os folículos alcançam aproximadamente 4,0 mm (Ginther, 2000; Adams et al., 1992). Depois que a onda alcança o pico, as concentrações de FSH caem por alguns dias enquanto os folículos crescem de 4,0 para 8,5 mm (Ginther et al., 1999; Ginther et al., 1997;) embora continuem sendo FSH-dependentes (Ginther et al., 2000a).

3. Métodos utilizados em dosagens hormonais

3.1. Considerações gerais

As dosagens dos esteroides sexuais, como P4 e E2, pela sua importância, foram e continuam sendo largamente utilizadas nas pesquisas em reprodução animal, nos estudos de fisiologia, patologia e biotecnologia reprodutiva. Vários métodos para a quantificação destes esteroides foram desenvolvidos, porém cada metodologia analítica possui vantagens e limitações.

O Rádio Imune Ensaio (RIA) é o mais amplamente utilizado, pela sua eficiência e aplicabilidade em diversas espécies, mas tem como principal desvantagem o envolvimento de material radioativo. A preocupação neste setor, aliada as exigências das legislações nacionais e internacionais em questões ambientais, tem aumentado a necessidade do desenvolvimento de novas técnicas sem a utilização de material radioativo (Lopes et al., 2015).

O diagnóstico de desordens endócrinas e o conhecimento da regulação fisiológica dos hormônios levaram ao desenvolvimento de vários métodos de dosagens. Antes da década de 60, substâncias presentes em pequenas quantidades no sangue e em outros fluídos, eram extremamente difíceis de serem dosadas. Até então, quimio e bioensaios dessas substâncias, usualmente hormônios, eram realizados, obtendo-se respostas com pouca precisão e exatidão (Silva et al., 2001).

Existem poucos resultados validados para as dosagens hormonais por quimioluminescência para a maioria das espécies, sendo que a grande maioria das validações que existem se concentram nas técnicas de RIA.

O RIA foi desenvolvido inicialmente para a dosagem de insulina por Yallow e Berson, em 1960, e vem sendo substituído gradativamente por outros métodos imunológicos, como os que utilizam compostos fluorogênicos, quimioluminogênicos e enzimáticos como marcadores (Moura, 2001).

As metodologias utilizadas para dosar esteroides têm sido adequadas de acordo com o avanço tecnológico, com o surgimento de testes cada vez mais

sensíveis e específicos, melhorando a precisão dos resultados. Diversas técnicas vêm sendo desenvolvidas, porém cada técnica possui vantagens e limitações (Furtado, 2007; Vignali, 2000; Gil et al., 1999).

As tendências da utilização de RIA, já no final do século passado, apontavam para o desenvolvimento de ensaios mais rápidos, utilização de sistemas de detecção não radioativos e desenvolvimento de métodos de análise de multianálitos (multiparamétricos) (Gil et al., 1999).

Técnicas não radioativas, como o ensaio imuno-enzimático por quimioluminescência foram difundidas nos últimos dez anos e são uma alternativa ao uso do RIA, seu custo é menor e sua disponibilidade maior, visto que é comumente utilizada em laboratórios humanos. Esta técnica apresenta limites de detecção (sensibilidade analítica) comparáveis ou superiores ao RIA e poucas validações foram realizadas entre elas a de uso em gatos (Horney et al., 1999; Singh et al., 1997)

Poucos e raros estudos têm demonstrado a eficiência dos ensaios de quimioluminescência em Medicina Veterinária e Zootecnia, quando comparados a outras metodologias: Armbruster e Williams (1988) ; Bonini et al. (1988) e Martin et al. (1988a) para Tiroxina; Salinas, et al. (1988), para hormônios tireoidianos; Kohen et al. (1986), para E2 e P4; Martin et al. (1988a), para cortisol; Armbruster e Williams. (1988) e Barlow et al. (1989) para ferritina.

Uma metodologia alternativa, tem sido utilizada com menos frequência que o RIA, mas já vem sendo substituída, devido as dificuldades de automação e da instabilidade das reações deste último, uma vez que o grau de automação é bem baixo. A metodologia contempla bons resultados, mas com sensibilidade analítica e linearidade, ligeiramente inferiores ao RIA. Em termos de agilidade e não produzir danos no meio ambiente, se tornou por um período uma metodologia alternativa ao RIA.

A ausência de valores de referência para as concentrações hormonais de bovinos no Brasil pode ser um dos fatores que contribuem para a escassez de dados que levam à ineficiência das técnicas que dependem destes (Vieira, 2010).

Os valores de referência utilizados no país são importados de países como os Estados Unidos, o que pode não refletir a realidade brasileira (Oshashi, et al., 2001), daí a necessidade de estabelecimento de valores de referência específicos por regiões para os hormônios avaliados.

Pela grande importância de se avaliar as concentrações hormonais durante a vida reprodutiva dos animais domésticos, e pela falta de informações relacionadas à estas dosagens em Medicina Veterinária e Zootecnia é que se faz necessário a disponibilidade de outras metodologias, que sejam sensíveis, precisas e de fácil manipulação para a determinação de valores de referência que possam ser utilizados na performance reprodutiva desses animais.

3.2. Aspectos Imunológicos dos ensaios

A imunologia é a ciência que estuda os mecanismos de defesa dos organismos vivos, em particular de humanos e outros mamíferos. De uma maneira bem simples, a resposta imunológica de organismos vivos (exceto plantas) se dá em contato com antígenos (Ag) (Imunogênicos) que são capazes de desencadear uma reação, ativando linfócitos, glóbulos brancos (GB) e a síntese de anticorpos (Ac) específicos (Sistema Imune Humoral) (Yong, 1984).

Os Ac são proteínas de alto peso (massa) molecular (PM), em torno de 150 Kd. Já os Ag devem possuir, além de certa complexidade química que os diferencie das substâncias reconhecidas pelo organismo, apresentar PM pelo menos de 1 Kd (Yong, 1984).

Ac também denominados de imunoglobulinas (Ig) possuem duas cadeias denominadas leves (25 KD) e duas cadeias denominadas pesadas (50 KD) que estão ligadas entre si por pontes dissulfeto, tomando uma estrutura simétrica de Y, as cadeias têm uma parte amino terminal, próxima ao topo da estrutura em Y, onde se encontra o sítio determinante do Anticorpo, denominado Fab (Benjamini e Leskowitz, 1983).

As sequências de amino ácidos neste seguimento determinam a especificidade do Ac e o tipo de Imunoglobulina (Ig), estas são agrupadas em cinco

grupos IgA (Imunoglobulina A), IgG (Imunoglobulina G), IgE (Imunoglobulina E), IgD (Imunoglobulina D) e IgM (Imunoglobulina M).

Os Ag podem ser classificados em Uni ou multideterminados e Uni ou multivalentes (Benjamini e Leskowitz, 1983).

As características de uni ou multideterminados relacionam-se à possibilidade de ser ter um ou mais tipos de epitopos (grupos funcionais determinados na interação Ag-Ac), uni ou multivalentes, relacionam-se à repetição de cada tipo de epítipo (Benjamin e Leskowitz, 1983).

A interação que ocorre entre Ag e Ac é relativamente fraca, envolve ligações não covalentes, mas Wan der Valls, eletrostáticas, ligações de hidrogênio e ligações hidrofóbicas (Skelley et al., 1973).

Estas interações ocorrem a curta distância, de modo que, as moléculas contendo determinante antigênico ou estruturas muito similares (reação cruzada) ligam ao sítio Ag ligante do respectivo Ac (Jones et al., 1997).

A combinação de imunologia à química analítica tem sido bastante explorada em análises clínicas (Laurino et al., 1997; Shen et al., 1997).

Em 1971, Engval e Perlman determinaram quantitativamente a Imunoglobulina G pela técnica de Enzima imuno ensaio (técnica imunoenzimática).

Considerando-se o número crescente de substâncias a serem utilizadas na avaliação do processo reprodutivo, tais como, Hormônios, peptídeos e fatores de crescimento, existe a necessidade de se empregar novas técnicas de alta seletividade (Adamczyk et al., 1998).

Outro ponto importante que deve ser bem pré-estabelecido no planejamento do imunoensaio, diz respeito aos sistemas de detecção. Estes definirão a escolha de marcadores adequados, os quais devem apresentar boa estabilidade, boas sensibilidade e especificidade e principalmente baixo custo, de fácil conjugação e fácil detecção (Kricka, 1996).

Tabela1: Sistemas de detecção e marcadores para dosagens hormonais

Sistemas	Exemplos de marcadores
Eletroquímicos	Enzimas: Peroxidase e oxidases
Radioisótopos	Isótopos ^{125}I ; ^{14}C ; ^3H
Fluorimétricos	Fluorescência, quelatos de lantanídeos
Fluorescentes	Fluorescência, compostos fluorescentes
Luminescentes	Luminol, Isoluminol, Luciferina, Acridina e Dioxetanos

Fonte: Girotti et al.(1997); Horaceck e Skladal (1997); e Tsuji et al. (1989).

Dependendo do sistema de detecção empregado, pode-se definir o formato do Imunoensaio (IA) que se divide em homogêneo e heterogêneo, sendo que no primeiro caso, para a detecção não se faz necessária a separação, entre as fases ligadas e livres, já a segunda utiliza a separação dessas fases para que a reação ocorra (Gil et al., 1999).

A obtenção dos Ac num hospedeiro adequado, existem dois tipos de Ac em IA, os policlonais e os monoclonais, estes últimos apresentam maior especificidade que os policlonais, maior afinidade por um epítipo específico e menor probabilidade de reações cruzadas entre Ag similares (Kempe, 1996; Tsuji et al., 1989).

Os Ac policlonais obtidos por meio de imunização do hospedeiro adequado, quando a titulação é satisfatória, o sangue é coletado da veia central da orelha ou por punção cardíaca. Separa-se o soro por centrifugação e obtém-se a mistura de Ac que se ligam a diferentes epítopos do hapteno conjugado, além dos Ac oriundos da resposta a outros imunógenos presentes no organismo. Se necessário, pode-se separar o Ac desejado por cromatografia de bio afinidade (Sherry, 1992;).

Já os Ac monoclonais são produzidos por linhagens segregadas e imortalizadas de Linfócitos B, sendo que a princípio se imuniza o hospedeiro, estimulando a população de linfócitos produtores dos Ac desejados, estes, entretanto podem sobreviver em culturas por poucos dias. Para contornar esta limitação, células malignas de linfócitos são incubadas separadamente. Estas por sua vez, apresentam limitações quanto à produção de Ac e muitas vezes requerem suprimentos da enzima Hidroxixantina fosfororibosil transferase (HPRT). As células malignas são então fundidas aos linfócitos B, originando-se os hibridomas, que produzirão Ac monoclonais e de maneira permanente (Gil et al., 1999).

As interações Ag-Ac ou Hapteno-Ac, são classificadas em primárias e secundárias. As primárias envolvem exclusivamente a ligação do determinante antigênico (epítopo) com o sítio ligante (Paratopo Ac específico). O equilíbrio químico destas interações primárias pode ser estudado utilizando-se haptenos (H) em razão de que estes são univalentes e uni determinados (Hawcroft et al., 1997).

Em imunoenaios quantitativos, utilizam-se exclusivamente reações primárias entre Ac e Haptenos, estes podem ser classificados com base nos seguintes aspectos: a) Homogeneidade: homogêneos ou heterogêneos; b) Sobre qual espécie de Ac ou Ag será introduzido um marcador ou enzima; c) Tipo de marcador ou enzima ou método de detecção empregado; d) Tipo de Ac: monoclonal ou policlonal; e) competitivo ou não competitivo.

3.3. Metodologias utilizadas na avaliação hormonal

3.3.1. Aspectos gerais

Com a grande demanda das dosagens hormonais e pela grande dificuldade operacional e também por dificuldades comerciais, se tornou necessário a adoção de novas metodologias alternativas as existentes, com redução dos tempos de execução e maior grau de automação.

O fator mais marcante em imuno análises é o ganho em seletividade, dada a grande especificidade de Ac por seus Ag (Santandreu et al., 1998).

Diversas técnicas e métodos analíticos são baseados em medidas físicas, químicas e físico-químicas de um sistema envolvendo reação química que se inicia com uma dada velocidade e tende ao equilíbrio (Ferreira e Rossi, 2002).

3.3.2. Metodologia Radio Imuno Ensaio (RIA)

A técnica utilizando Ac como ligantes (imunoenaios) foi descrita pela primeira vez por Yallow e Berson em 1960. O trabalho de Yallow e Berson, começou com os estudos sobre o comportamento do ^{131}I , marcando proteínas *in vivo*. O

trabalho consistiu na injeção de insulina marcada e não marcada, verificando que o Ag não marcado, por competição, inibia a ligação do Ag marcado ao Ac. Desenvolveram um ensaio para detectar e quantificar a insulina no soro de pacientes utilizando Ac anti-insulina, baseando numa nova técnica de ensaios de ligação por competição. Neste mesmo ano (1960), Ekins, na Inglaterra, desenvolveu um método similar para a determinação da concentração de Tiroxina no plasma sanguíneo, o qual era também baseado no princípio da ligação competitiva, embora se empregasse uma proteína carreadora ao invés do Ac.

Vários pesquisadores utilizaram o RIA como técnica na avaliação hormonal de bovinos (Sartori et al., 2016; Martin et al., 2013; Gimenes et al., 2008; Baruselli et al., 2007; Parker et al., 2007; Borges et al., 2003; Bryner et al., 1990).

Surgiram várias técnicas de medição de hormônios e outras substâncias presentes em quantidades mínimas nos fluídos corpóreos (drogas, enzimas e hormônios), sendo utilizados amplamente o RIA (Silva et al., 2001).

Ao longo do tempo o RIA, desenvolvido inicialmente para a dosagem de insulina por Yallow e Berson, em 1960 constituiu-se num grande avanço no campo dos imunoensaios (IA) quantitativos (Jackson e Ekins, 1986), seguido pelo surgimento da metodologia enzima imunoensaio (EIA), como o Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), tendo a enzima como meio alternativo de detecção (Gascon et al., 1997; Mercader et al., 1997).

Encontram-se na literatura diversos relatos na área de reprodução animal que utilizam a tecnologia do RIA para quantificar P4 e E2 séricos em diferentes espécies. Essa tecnologia revolucionou o entendimento da fisiologia e da endocrinologia em quase todas as espécies animais. A técnica RIA se baseia no uso de um agente ligante específico e de hormônios conjugados a um isótopo radioativo, como traçadores, para medir a concentração hormonal. 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 à concentração do

hormônio não radioativo a ser dosado (Furtado, 2007; Senger, 2005; Thorel e Larson, 1978).

Os ensaios competitivos presentes no RIA, onde a concentração de analito compete com o analito marcado com o marcador radioativo é extrapolado na curva de calibração, radioligantes contados na ordem de pg (picogramas), limite de detecção de 10^{-14} M, vão depender diretamente da sensibilidade dos isótopos: ^{125}I , ^{14}C , ^3H , são os mais utilizados com radioatividade específicas de 2170 Ci/mmoL, 29,2 Ci/mmoL e 62,4 Ci/mmoL respectivamente (Bolton, 1981).

Embora o ^{125}I apresente a maior radioatividade específica, há a desvantagem de diminuir a similaridade entre o marcado (rádio ligante) e o hapteno a ser analisado. A vantagem deste método era ser de baixo custo na década de 80 e possuir vasta literatura (Jackson e Ekins, 1986).

Como todas as metodologias RIA apresenta algumas desvantagens em relação ao seu uso, apesar de ser considerada uma metodologia prática e apropriada para as dosagens dos hormônios esteroides e ser extensamente utilizada nos laboratórios clínicos e farmacológicos, a mesma vem ocasionando vários problemas, tais como: conservação e estabilidade dos componentes marcados radioativamente; alto custo ; dificuldade de aquisição deste produto; baixa disponibilidade; perigo à saúde humana devido à exposição e manuseio dos hormônios marcados radioativamente.

3.3.3. Métodos imunoenzimáticos (EIA)

3.3.3.1. Características gerais

Os ensaios imuno enzimáticos (EIA) são aqueles que utilizam reações imunológicas e enzimas na sua reação, foram mais empregados a partir da década de 90, sem riscos a exposição a radioisótopos, amplificação catalítica (uma enzima, várias espécies detectáveis) e da associação com outros marcadores, por exemplo, Quimioluminescência, Fluorescência e ELISA, que resultam em ensaios de baixo limite de detecção (Tsuji et al., 1989).

As enzimas e fluoróforos representam os marcadores mais frequentes, as interações Ag-Ac ou Ac-Ag tem que provocar mudanças significativas no sinal para o marcador, por estes ensaios não requererem métodos de separação têm sido focos de intensas investigações, especialmente para o desenvolvimento de imunoenaios para a detecção de agrotóxicos (Purchades et al., 1992) em matrizes complexas, como amostras brutas ambientais (Sherry, 1992) e sangue (Ducey et al., 1977) entre outras e ainda não exigem o tratamento da amostra por separação ou lavagem e tem sido alvo de muita investigação, constituindo o tipo de ensaio homogêneo (Kricka, 1996).

Os fluoroimunoenaios são em geral, baseados na transferência de energia de excitação do Ag, hapteno ou Ac marcados para o Ac e Ag também marcados, este efeito resulta na intensificação da fluorescência e ou pode ter efeito reverso, resultando na supressão da fluorescência no caso de interação entre as espécies marcadas com as espécies não marcadas. A fluoresceína e rodamina são utilizadas respectivamente, como doadores e receptores (Purchades et al., 1992).

As vantagens de menor número de etapas, que resulta em maior precisão e ganho em tempo, mas apresentam limitações dos imunoenaios quanto a sensibilidade, como exemplo temos EMIT, CEDIA e alguns Fluoroimunoenaios (Kricka, 1996).

3.3.3.2. A Escolha do método

Nas últimas décadas com a crescente utilização das concentrações hormonais como ferramenta de auxílio no manejo reprodutivo dos animais de corte e leite, se faz necessário realizar dosagens do perfil hormonal reprodutivo, por métodos que tragam resposta mais rápida e menos trabalhosa, que apresentem grande sensibilidade e linearidade sem, contudo, perder a sensibilidade apresentada pelas metodologias convencionais (RIA e ELISA).

A necessidade de um método a ser utilizado como alternativa aos existentes, com menos entraves tais como, dificuldade de automação, maior grau de manipulação, radioatividade, meia vida e outras, sendo operacionalmente mais

simples, possa ser utilizado sem obrigatoriedade de infraestrutura especial e licenças governamentais, não utilizam materiais radioativos e menor possibilidade de erro pelo seu alto grau de automação.

Metodologias devem demonstrar as diversas fases do ciclo estral, acompanhando o desenvolvimento folicular e que confirmem o comportamento fisiológico destes hormônios nas fases do ciclo estral e se relacionem com as diversas etapas do desenvolvimento folicular, mostrando variação concernente às diferentes medidas do tamanho dos folículos obtidos por Ultrassom transretal.

Esta metodologia a ser adotada deve reduzir os riscos operacionais dos usuários ao manusear estas técnicas, bem como reduzir o número de etapas nos processos analíticos, reduzindo erros e custos e desprezando a necessidade de dosagens em duplicatas.

A metodologia da técnica imunoenzimática alia a especificidade com as baixas concentrações presentes nestas reações imunológicas, contendo baixas concentrações enzimáticas, que melhoram o grau de sensibilidade do método, reduzindo prazos de execução, aumentando a sensibilidade e também incrementando a automação.

A separação em fase heterogênea dessa metodologia pode ser uma opção a ser utilizada, tornando-a capaz de medir somente o que se deseja realmente avaliar, impedindo o arraste de qualquer natureza e reações cruzadas, que possam interferir nas dosagens hormonais.

A presença de grande faixa analítica para que os valores destas dosagens se encaixem facilmente dentro destas faixas inerentes aos animais e que possam ser avaliados e correlacionados com a vida útil do animal, sendo que esta faixa analítica deve vir acompanhada, por boa sensibilidade analítica e uma linearidade compatível com as diversas fases do ciclo estral dos bovinos, quando da sua avaliação hormonal.

3.3.3.3. Enzyme Linked immuno Sorbent assay

(ELISA)

O mais comum método para detecção de imunoensaio enzimático é o (ELISA), que foi primeiro reportado por Engvall and Perlmann in 1971 (Porstmann e Kiessing, 1992).

A metodologia ELISA é um procedimento de ensaio imuno enzimático do tipo heterogêneo, cujo nome se deriva do inglês (Szurdoki et al., 1997; Porstmann e Kiessing, 1992).

A prova recorre ao emprego de imunógenos, haptenos ou Ac marcados com uma enzima para revelar o reagente complementar ao nível dos fluidos biológicos: revela a quantifica diversos tipos de substâncias presentes em líquidos orgânicos: antígenos, Ac, hormônios e fármacos (Roa Noris et al., 1997).

O ensaio imuno enzimático pode ser classificado em dois grupos: “analito-observado” e “reagente-observado”. O primeiro utiliza o excesso de amostra, e o segundo excesso de Ac (reagente marcado), sua escolha vai depender do tipo de reação. O “analito-observado” é favorecido pelo uso de Ac monoclonais caracterizado por grande sensibilidade, grande faixa analítica, baixa susceptibilidade aos distúrbios, deve ser utilizado quando o analito for de alto peso molecular (PM), difícil de purificar por insuficiente quantidade do marcado (conjugado) e requer alta sensibilidade. Se o analito é pequeno, fácil de isolar, sintetizar e marcar, e não existir requerimentos especiais na sensibilidade do ensaio, sua determinação poderá ser realizada no ensaio tipo II (Porstmann e Kiessing, 1992).

Limitado número de enzimas está adaptada como “marcadores” na montagem dos conjugados para os imuno ensaios, a Peroxidase, mais utilizada e a fosfatase alcalina são as mais escolhidas e elas não podem estar covalentemente ligadas ao Ac.

O teste de ELISA baseia-se na utilização de Ac mono ou policlonais contra o analito em questão (P4, LH, FSH), fixados em um pocinho (well), numa microplaca, que captura o analito da amostra, um segundo Ac é utilizado como conjugado

(marcado), utilizando uma enzima acoplada. Após a adição do analito (amostra), o conjugado é adicionado, formando um complexo Ac-analito-conjugado, técnica de sandwich direto, empregada para FSH e LH, a quantidade de luz absorvida no complexo, será plotada em um gráfico de absorvância (DO) x concentração do analito, e a quantificação será diretamente proporcional a DO gerada após a degradação do substrato presente no cromógeno.

Numa segunda técnica (competitiva), há uma competição entre a amostra (analito) e o conjugado, que é um segundo Ac conjugado com uma enzima, a quantidade de luz absorvida é inversamente proporcional à concentração do analito.

Estes kits para P4 vem sendo utilizados nos USA e em outros países para a determinação de P4 no leite e no soro, com custo muito alto para os padrões brasileiros (Strelczuk, 2015).

Em um trabalho para P4 foi obtido um CV inter ensaio de 6,50% e CV para o intra ensaio de 5,77%.

Existem alguns kits específicos para ratos, coelhos e camundongos, mas poucos são os utilizados para bovinos, exceto, alguns para P4 nas dosagens em leite e soro.

3.3.3.4. A quimioluminescência

A partir de novas perspectivas tecnológicas, como a robótica e técnicas sofisticadas de tratamento de dados (Crouch, 1993), indicando tendência para estudos com métodos cinéticos, que podem ser resumidos em: aumento do uso da automação inteligente, ou seja, todas as condições de análise controladas pelo computador; crescimento da utilização de dados multidimensionais; desenvolvimento de técnicas sofisticadas de tratamento de dados; progresso nos métodos de compensação de erros; inovações dos procedimentos cinéticos multicomponentes; expansão das aplicações da determinação cinética e; aplicação das aproximações cinéticas para vários tipos de respostas dependentes do tempo (Ferreira e Rossi, 2002).

De maneira geral, além da seletividade, as imunoanálises apresentam também, dependendo do marcador ou do sistema de detecção utilizado grande sensibilidade e linearidade (Gascon et al., 1997; Kricka, 1996; Krishnam et al., 1996).

Desde a antiguidade, fenômenos da emissão de luz, como a quimioluminescência, eram descritos, mas, por muito tempo e foram associados a mitos ou fantasmas. Em 1969, o médico H. Brandt, a partir da destilação exaustiva de ureia, produziu fósforo que, devido a sua oxidação pelo oxigênio do ar, produzia luminescência (Campbell, 1988).

A primeira descrição de bioluminescência foi encontrada no livro de Odes, um dos treze clássicos datados de 1500-1000 A.C. Escrituras de civilizações antigas contém referências e dados mitológicos sobre animais luminosos como o vaga-lume e sobre fenômenos como o corpo brilhante e a floresta incandescente, sendo os gregos e os romanos os primeiros a descrever as características. Ptiny (1885) é citado por ter descrito vários organismos luminosos, como a medusa (*Pelágia noctiluca*), o peixe lanterna (*Lucema piscis*), o molusco luminoso (*Pholas dactylus*), o vagalume e os fungos luminosos. Os vaga-lumes eram chamados pelos gregos de lamparinas por brilharem a noite como "faíscas de fogo" (Ciarlini et al., 2002).

Faria-Oliveira (1995) relatam que as observações e descobertas históricas, como a pedra da Bologna, que absorvia luz do sol e reemitia no escuro, a incandescência, a luminescência, a luz como partícula, a luz como onda, a fluorescência e a fosforescência, as leis da radiação eletromagnética, entre outras, levaram Wiedmann, em 1888, a estabelecer o nome de quimioluminescência.

A partir destes resultados, em 1888, Wiedemann conseguiu distinguir a quimioluminescência, definindo-a como a "emissão de luz que ocorre junto a processos químicos". Desde essa época, as reações quimioluminescentes tem sido objeto de estudos para a elucidação dos mecanismos envolvidos e da atuação de outras espécies que afetam a quimioluminescência, outras substâncias como Luminol, Lucigerina, isoluminol, estanodioato de Bis (2,4,6 - Triclorofenila), Pirogalol, Luciferina, Dioxetano, participam com substratos de reações quimioluminescentes (Ferreira e Rossi, 2002).

O desenvolvimento dos métodos cinéticos de análise com reações de quimioluminescência já é uma realidade, principalmente considerando-se o aspecto de baixo custo da técnica e a sensibilidade da reação. Novos trabalhos deverão ser encorajados para mais estudos para a aplicação das mesmas em Medicina Veterinária e Zootecnia, da mesma maneira que vem sendo utilizado em Medicina humana (Ferreira e Rossi, 2002).

As técnicas não radioativas, como o ensaio imunoenzimático por quimioluminescência, foram difundidas nos últimos 30 anos e estão se tornando uma alternativa ao RIA, em Medicina Veterinária e Zootecnia. Seu custo é menor e sua disponibilidade é maior visto que é comumente utilizada em laboratórios humanos. Esta técnica apresenta limites de detecção comparáveis ao RIA e já foi validada para uso em gatos (Horney, 1999; Singh, 1997). Apesar de suas vantagens, o método quimioluminescente permanece pouco utilizado para dosagens hormonais em animais (Ferreira e Rossi, 2002).

As dosagens hormonais por quimioluminescência, não necessitam de duplicatas, não requerem o uso de marcadores radioativos e são realizadas por um sistema totalmente automatizado, diminuindo assim os erros relacionados à pipetagem e à preparação dos reagentes, além de ser um método tão preciso quanto o RIA e mais sensível que o ELISA (Ciarlini et al., 2002; Richardson et al., 1985).

O método de quimioluminescência é uma técnica pela qual se obtém energia luminosa por meio de uma reação química. Esse imunoenensaio utiliza um sistema que baseia em unidades-teste, recoberto com Ac específico, como ensaio em fase sólida, servindo como recipiente para a reação imune, a incubação, a lavagem e o desenvolvimento do sinal luminoso (Singh, 1997).

A quimioluminescência possui como vantagens: a praticidade de execução e a menor variação durante a pipetagem, pois o operador só precisa colocar os tubos nas racks de operação, podendo utilizar tubos primários, oriundos da coleta do material, sem precisar alíquotas, os demais reagentes são colocados em packs, sem a necessidade de preparo, uma vez que serão adicionados pelo próprio equipamento, a não utilização de material radioativo; maiores prazos de validade

dos produtos, possibilitando um maior aproveitamento e a possibilidade de execução de mais de um teste para uma mesma amostra sem a necessidade de permanência por muito tempo dentro do equipamento. A sensibilidade equiparada ao RIA e principalmente a grande dificuldade de validação do método, pela dificuldade de aquisição do teste já validado, RIA. Ao contrário do RIA e ELISA a quimioluminescência é um sistema fechado de análise, ou seja, sistema automatizado, que não permite ao operador interferir nas diferentes etapas do processo (Lima, 2012).

No imunoensaio quimioluminescente, o Ac sinalizador é marcado com um composto quimioluminescente, que emite luz quando combinado a um reagente disparador, como resultado de uma reação química. O luminol e o isoluminol foram os primeiros compostos quimioluminescentes a serem usados em imunoensaios e, atualmente, há vários compostos disponíveis, entre eles os ésteres de acridina e sulfonamida, a fosfatase alcalina, cujos reagentes disparadores podem ser o éster fosfatado do adamantildioxetano, fosfato acridanenol e dioxetano lauril fosfato (Dudley, 1990).

A eficiência da emissão de luz de uma molécula quimioluminescente é expressa como rendimento quântico da quimioluminescência (f_a), o qual descreve o número total de fótons emitidos/número de moléculas reagentes: $f_a = f_c + f_E + f_f$, onde, f_c = rendimento químico, f_E = rendimento de moléculas em estado eletricamente excitado, f_f = rendimento quântico da fluorescência (Weeks, 1997).

O ensaio quimioluminescente apresenta o formato "*sandwich*". A amostra biológica em que se deseja pesquisar o analito é incubada com o anticorpo da fase sólida e o anticorpo da fase líquida, sinalizador, ligado ao marcador (enzima) quimioluminescente e, em seguida, o material não ligado é removido por uma etapa de lavagem. É adicionado então o reagente "disparador", e a emissão de luz é proporcional a quantidade de analito (Ac) presente na amostra, sendo quantificada por detector de luz. Esse método é amplamente empregado em dosagens hormonais, em Medicina humana, assim como em outras finalidades, incluindo-se o sequenciamento de DNA e a determinação da atividade enzimática de proteínas

codificadas por genes repórteres. Suas vantagens incluem elevada sensibilidade e a rapidez com que é efetuado (Dudley, 1990).

Existe também na quimioluminescência, a utilização do método indireto ou competitivo, onde um analito a ser analisado compete para o mesmo sítio de ligação com uma molécula similar ao analito, mas com menor avidéz, que nas técnicas imunoenzimáticas utiliza a enzima como marcador, sendo muito empregado nas análises de hormônios esteroides (Dudley, 1990).

Uma variação do ensaio de quimioluminescência é quimioluminescência magnética, em que o Anticorpo de captura é ligado a micropartículas paramagnéticas, e os imunocomplexos, Ac de captura-analito-anticorpo sinalizador, são separados dos Ac sinalizadores não ligados por um campo magnético (Dudley, 1990).

As principais características das reações por quimioluminescência adequadas para a aplicação analítica são os excelentes limites de detecção (sensibilidade analítica) que podem ser alcançados e a simplicidade da instrumentação necessária para registrar o sinal analítico (Robardis e Worsfold, 1992).

Limites de detecção na ordem de fentomol (10^{-15} mol) não são incomuns em técnicas (métodos) de quimioluminescência e em alguns sistemas enzimáticos já foram detectadas cerca de 120 moléculas de analitos (Robardis e Worsfold, 1992).

A quimioluminescência está bem descrita para a determinação dos hormônios esteroides, proteicos e outros componentes biológicos, principalmente em Medicina Humana (Pizzagli e Serio, 1986).

Quando comparada ao RIA, existem algumas vantagens da quimioluminescência, descritas nos parágrafos abaixo.

Não utiliza material radioativo, não havendo desta maneira, o problema inerente ao manuseio de substâncias radioativas, como proteção radiológica, descarte apropriado, monitoramento do pessoal;

Possuir maiores validades que as metodologias tradicionais, aumentando seu tempo de uso e possibilitando uso racional da metodologia;

Método automatizado em que não há manuseio de amostras e reagentes, evitando-se, assim, os tradicionais erros de pipetagens e trocas de reagentes e amostras, com isso, é possível também propiciar metodologias com técnicas de resultados mais apurados do ponto de vista do coeficiente de variação intra-ensaio e, além disso, diminui o risco de acidentes com materiais biológicos ou reagentes, oferecendo maior grau de segurança pelo operador;

Possibilidade de dosagens individuais, sem a necessidade de se completar placas;

Possibilidade de utilização de reagentes compartimentalizados sem a necessidade de preparações e exposições desnecessárias;

Identificação dos reagentes por código de barras, identificação positiva dos reagentes, com quantificação automática; reagentes hermeticamente fechados, impedindo diferenças de concentrações dos constituintes, impedindo variações;

Em virtude do alto desempenho da automação do equipamento, as transferências de líquidos e pipetagens são realizadas de maneira precisa, conferindo, assim, segurança para a execução dos testes em uniplicata, sem a necessidade de repetições intra-ensaio;

Possibilita a execução de vários testes (analitos) de uma amostra de uma única vez, oferecendo maior rapidez para a obtenção dos resultados;

Oferece maior estabilidade das curvas de calibração, devido às embalagens compartimentalizadas e hermeticamente fechadas, sem risco de evaporação e mudanças na concentração dos constituintes.

3.3.3.5. Outras aplicações da quimioluminescência

Em solução, a quimioluminescência pode ser empregada em várias aplicações analíticas para a determinação de íons metálicos, ânions orgânicos, biomoléculas, substâncias carcinogênicas e drogas em diferentes matrizes ambientais e clínicas (Robardis e Worsfold, 1992; Worsfold e Yan, 1991).

Dentre os diferentes tipos de espécies analisadas por esta técnica, o controle de compostos orgânicos no meio ambiente, como pesticidas (Jimenes e Navas,

1997) e compostos S derivados do petróleo (Navas e Jimenez, 2000) são exemplos de destaque pela grande sensibilidade e especificidade.

Uma reação de quimioluminescência de grande importância envolve a oxidação de luciferina, a luz do vaga-lume, na presença de ATP, utilizada para a determinação de biomassa e da presença de vida em corpos estelares, além de servir como forma de detecção de vários imunoenaios (Worsfold e Yan, 1991). Outra reação das mais aplicadas em métodos analíticos é a oxidação do luminol em meio alcalino (Mottola, 1988).

Já Fonseca (1994) descreveu um método quimioluminescente simples e sensível para a caracterização da mielo-peroxidase intracelular, útil para a diferenciação entre blastos comprometidos com a linhagem mielóide de pacientes com leucemia aguda.

Kohen et al. (1988a) desenvolveram um imunoenensaio quimioluminescente que permite monitorar a concentração plasmática de drogas, como a digoxina, obtendo resultados similares ao método do imunoenensaio com polarização fluorescente que é o rotineiramente utilizado pelos laboratórios clínicos.

Objetivando avaliar o metabolismo de oxi-redução Kamidate e Watanabe (1996) desenvolveram um método quimioluminescente para a determinação de glutathione, mensurado indiretamente pela quantidade de peróxido de hidrogênio formado durante a oxidação do glutathione.

3.3.4. Validação

O Conceito de validação segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) é a Confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos

O desenvolvimento de um método analítico, a adaptação ou a execução de um método envolvem processos de avaliação e validação que estimem a 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. Ela envolve processos complexos e extremamente elaborados (Furtado, 2007).

A literatura define critérios que devem ser seguidos para a validação de um método analítico. Entre esses, os parâmetros mais usualmente empregados envolvem 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 (Brito et al., 2003).

Os parâmetros avaliáveis na validação são; Seletividade/ Especificidade; exatidão; recuperação / veracidade; precisão (concordância valor verdadeiro e valor medido); dentro de precisão repetitividade; reprodutibilidade; limite de detecção; linearidade; faixa de trabalho (range analítico) e robustez (ANVISA, 2012).

3.3.5. O futuro da quimioluminescência em Medicina Veterinária e Zootecnia

No comércio estão disponíveis mais de 500 ensaios de quimioluminescência para o diagnóstico de processos alérgicos, neoplásicos, doenças infecciosas, avaliação endócrina, determinação de citosina, monitoramento de drogas, dentre outras, para utilização em Medicina humana (Ciarlini et al., 2002).

Torná-la em Medicina Veterinária e Zootecnia tão importante quanto na maioria das dosagens hormonais em Medicina humana, para que seja utilizada com maior frequência tanto no auxílio diagnóstico como na avaliação do desempenho reprodutivo e também nos processos de fertilização *In vitro* e transferência de embriões.

Existe a necessidade de se estabelecer valores de referência, para que estes valores sejam utilizados tanto em produção quanto em clínica, como auxílio diagnóstico, em Medicina Veterinária e Zootecnia, refletindo a fisiologia destes animais no seu meio ambiente, em menor tempo e com precisão e exatidão.

As dosagens por quimioluminescência podem ser utilizadas como alternativa ao RIA, porque contemplam as características necessárias e são de simples execução, com excelente sensibilidade analítica, capazes de detectar as menores quantidades hormonais ou enzimáticas nas diferentes espécies de animais, grande linearidade, fácil automação, ausência de pipetagens, ausência de manipulação de reagentes, reagentes prontos para uso, ausência de duplicatas, embalagens hermeticamente fechadas, impedindo evaporação e alteração na concentração, reagentes a bordo em equipamentos específicos que mantêm temperatura controlada de 2° a 8° graus centígrados, podendo permanecer a bordo até 28 dias, curvas estáveis em média por 28 dias, ou curvas com revalidação em dois pontos, facilidade de utilização de diversas unidades de medida, para atender todas as necessidades criadas quando da adoção de uma nova metodologia.

A semelhança com que ocorre com o RIA, alguns testes de quimioluminescência disponíveis no comércio para Medicina humana, podem potencialmente serem utilizados em Medicina Veterinária, mas é preciso fazer uma correlação mais detalhada do período do ciclo estral definido por acompanhamento do animal, por ultrassonografia transretal, em períodos menores de tempo. Para tal há a necessidade de se fazer mais estudos comparando os ensaios de quimioluminescência com outras metodologias disponíveis, ou então estudos de acompanhamento clínico ou de produção que respaldem a utilização desta metodologia em Medicina Veterinária.

Diante do potencial uso da quimioluminescência, têm sido divulgados alguns estudos iniciais que demonstram a eficiência dos sistemas de quimioluminescência que foram comparados alguns testes convencionais, Tiroxina Total para RIA x quimioluminescência em felinos (n=57) e (r=0,959); T4 livre em felinos (n=57) e (r=0,981); Digoxina em cães (n=35) (r=0,929) e Progesterona em cães (n=55) e (r=0,921) (Ciarlini et al., 2002).

A medicina humana tem experimentado nos últimos anos um grande desenvolvimento de metodologias de ensaios analíticos, baseados no princípio da quimioluminescência, cuja eficiência tem sido comprovada por inúmeros estudos. A importância da aplicação desta metodologia em Medicina Humana é indiscutível, e

seu potencial para uso em Medicina Veterinária é promissora, por ser um recurso analítico ecologicamente mais correto, dentro dos preceitos modernos, que irá beneficiar de uma maneira ampla ao auxílio diagnóstico e avaliação do desempenho reprodutivo.

4. Referências Bibliográficas

ADAMCZYK, M.; FISHPAUGH, J.R.; HEUSER, K.J.; RAMP, J.M. **Tetrahedron**, V.54, p.3093, 1998.

ADAMS, G.P.; JAISWAL, R.; SINGH, J.; MALHI, P. Progress in the ovarian follicular dynamics in cattle. **Theriogenology**, v. 69, n.1, p. 72-80, 2008.

ADAMS, G.P.; MATTERS, R.L.; KASTELIC, J.P.; KO, J.C.H.; GINTHER, O.J. Association between surges of FSH and emergence of follicular waves in heifers. **Journal Reproduction and Fertility**, v.94, p.177-188, 1992.

ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L.; GINTHER, O.J. Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. **Journal Reproduction and Fertility**, v.95, n. 2, p. 627-640, 1992a.

ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L.; KASTELIC, J.P.; KO, J.C.H. Association between surges of follicle stimulating and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 94, n.1, p. 177-188, 1992b.

ADEYEMO, O.; HEATH, E. Plasma progesterone concentration in Bos taurus and Bos indicus heifers. **Theriogenology**, v.14, n.6, p.411-420, 1980.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, Brasil. Resolução no. 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registros e pós-registros de medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 maio de 2012, Sec. 1, p.33.

ALGIRE, J.E.; SRIKANDAKUMAR, A.; GUILBAULT, L.A.; DOWNEY, B.R. Preovulatory changes in follicular prostaglandins and their role in ovulation in cattle. **Canadian Journal Veterinary Research**, v.56, p.67-69, 1992.

ARMBRUSTER, D.A.; WILLIAMS, J.V. Enhanced luminescence immunoassays for the thyroxine (FT4) and ferritin. **Clinical Chemistry**, v.34, p.1162, 1988. Abstract.

BARBATO, O.; SOUZA, N.M.; DEBENEDETTI, A. et al. Validation of a new pregnancy-associated glycoprotein radioimmunoassay method for the detection of early pregnancy in ewes. **Theriogenology**, v.72, p.993-1000. 2009.

BARROS, C.M.; FIGUEIREDO, R.A.; PINHEIRO, O.L. Estro ovulação e dinâmica folicular em zebuínos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.19, n.1-2, p.9-22, 1995.

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

BENJAMINI, R.; LESKOWITZ, S. "Immunology: A short course", ed. Alan R. Liss, New York. p.35, 1983.

BERGFELT, D.R.; KUKICK, K.; KOT, K.; GINTHER, O.J. Response of follicles to experimental suppression of FSH during follicular deviation in cattle. **Theriogenology**, v.54, p.1191-1206, 2000.

BLOKEY, M.A. Sheep and cattle mating behavior. Armidale: **Review Rural Science**, V.4, p.53-62, 1980.

BOLTON, A.E. "Immunoassay for the 80s": in. Voller, A.; Bartlett, A.; Bidwell, D., ed.: University Park Press: Baltimore, p.69, 1981,

BONINI, P.A. et al. Free Thyroxin estimation by enhanced luminescent immunometric. **Clinical Chemistry**, v. 34, p.1207, 1988.

BORGES, A.L.; TORRES, A.L.; RUAS, J.R.M.; ROCHA JUNIOR, V.R.; CARVALHO, G.R. Desenvolvimento luteal e concentrações plasmáticas de progesterona em vacas das raças Gir e Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.2, p.246-283, 2003.

BOSCOS, C.M.; SAMARTZ, F.C.; LYMBEROPOULOS, A.G. et al. Assessment of progesterone concentration using enzyme immunoassay, for early pregnancy diagnosis in sheep and goats. **Reproduction of Domestic Animals**, v.38, p.170-171, 2003.

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

BRYNER, R.W.; GARCIA-WINDER, M.; LEWIS, P.E.; INSKEEP, E.K.; BUTCHER, R.L. Changes in hormonal profiles during the estrous cycle in old lactating beef heifers. **Domestic Animal Endocrinology**, v.7 (2), p. 181-190, 1990

CAMPBELL, A.K. Chemiluminescence: principles and applications in biology and Medicine. England: **VCH & Ellis Horwood**, p.607, 1988.

CASTILLO, C.; BRITO, L.F.C. Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first post-ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 98, n. 3-4, p. 189-196, 2006.

CAVALIERI, J.; RUBIO, I.; KINDER, J.E.; ENTWISTLE, K.W.; FITZPATRICK, L.A. Synchronization of estrus and ovulation and associated endocrine changes in *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, v. 47, n. 4, p. 801-814, 1997.

CIARLINI, L.R.P.; CIARLINI, P.C.; FEITOSA, F.L.F. Quimioluminescência: princípio e aplicações. **Revista Educação continuada CRMV-SP**, v.5, n.2, p.181-187. 2002.

CLARKE, J.J. GnRH secretion, In: INTERNACIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 5, 1988. **Anais.....Dublin**, 1988, p.1-9.

CROUCH, S. R. Trends in kinetic methods of analysis. **Analytical Chimica Acta**, v.283, p.453-470, 1993.

CUNNINGHAM, J.G. **Tratado de fisiologia Veterinária**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, P. 387-390, 2004.

CUPP, A.S.; STUMPF, T.T.; KOJIMA, F.N.; WEERTH, L.A.; WOLFE, M.W.; ROBERSON, M.S.; KITTOCK, R.J.; KINDER, J.E. Secretion of gonadotrophins change during the luteal phase of the bovine oestrus cycle in the absence of corresponding changes in progesterone or 17 Beta estradiol. **Animal Reproduction Science**, v. 37, n.2, p. 109-119, 1995.

DIONYSIUS, D.A. Pregnancy diagnosis in dairy goats and heifers using progesterone assay kits. **Australian Veterinary Journal**, v.68, p.14-16, 1991.

D'OCCHIO, M.J.; NEIDH, A.; BROADHURST, L. Differences in gonadotrophin secretion postpartum between Zebu and European breed cattle. **Animal Reproduction Science**, V.22, p.311-317, 1990.

DUCEY, M.W.; SMITH, A.M.; GUO, X.A.; MEYERHOFF, M.E. Competitive nonseparation electrochemical enzyme binding/immunoassay (NEEIA0 for small molecule detection **Analytical Chimica Acta**, V. 357, p.5-12, 1977,

DUDLEY, R. F. Imunoensaio por quimioluminescência: uma alternativa ao Radioimunoensaio (RIA). **Sociedade Americana de Patologia Clínica**, 28 (4): 5-10. Abr. 1990.

ESSLEMONT, R. J.; GLENCROSS, R.G.; BRYANT, M. J.; POPE, G.S. A quantitative study of pre-ovulatory behavior in cattle (British Friesian heifers). **Applied Animal Ethology**, v. 6, n.1, p. 1-17, 1980.

FERREIRA, C.F.; ROSSI, V.A. A quimioluminescência como ferramenta analítica: do mecanismo a aplicações da reação do luminol em métodos cinéticos de análise. **Química Nova**, v.25, n.6, p.1003-1011, 2002.

FINDLAY, J.K. Peripheral and local regulators of folliculogenesis. **Reproduction, Fertility Development**, v.6, n.2, p.127-139, 1994.

FONSECA, L.M. et al. Quimioluminescência em células blásticas leucêmicas e sua aplicação no diagnóstico diferencial de leucemias agudas. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, V.26, p.2-6, 1994.

FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of Reproduction**, v.50, p.225-232, 1994.

FORTUNE, J.E.; SIROIS, J.; QUIRK, S.M. The growth and differentiation of ovarian follicular during the bovine estrous cycle. **Theriogenology**, v. 29, n.1, p. 95-109, 1988.

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

GALINA, C.S.; ARTHUR, G.H. Review on cattle reproduction in the tropics. Part 4: Estrous cycles. **Animal Breed Abstract**, v.58, n.8, p.697-707,1990.

GALINA, C.S.; ORIHUELA, A.; RUBIO, I. Behavioral trends affeting oestrus detection in Zebu cattle. **Animal Reproduction Science**, V.42, p.465-473, 1996.

GASCON, J.; OUBINA, A.; BALLESTEROS, B.; BARCELO, D. and others; **Analytical Chimica Acta.**, v. 34, p. 1011, 1997.

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

GIMENES, L.U.; SÁ FILHO, M.F.; TORRES-JUNIOR, J.R.; BELTRAN, M.P.; NOGUEIRA, G.P; BARUSELLI, P.S. Perfil de FSH e LH na divergência folicular em novilhas nelore (*Bos indicus*). **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v.45, n.1, p. 11-16, 2008.

GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R.; BEG, M.A.; KOT, K. Follicle selection in cattle: role of luteinizing hormone. **Biology of Reproduction**, v.64, p.197-205, 2001a.

GINTHER, O.J. et al. Selection of the dominant follicle in cattle: role of estradiol. **Biology of Reproduction**, v.63, p.383-389, 2000b.

GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R.; KULICK, L.J.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: role of two-way functional coupling between follicle stimulating hormone and follicles. **Biology of Reproduction**, v.62, p.920-927, 2000a.

GINTHER, O.J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. **Animal Reproduction Science.**, v. 60-61, p. 61-79, 2000.

GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R.; KULICK, L.J.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8 hours through depression of FSH concentrations. **Theriogenology**, v. 52, n.6, p. 1079-1093, 1999.

GHINTER, O.J.; BERGFELT, D.R.; KULICK, L.J.; KOT, K. Pulsatility of systemic FSH e LH concentrations during follicular-wave development in cattle. **Theriogenology**, v.50, p.507-519, 1998.

GINTHER, O.J.; KOT, K.; KULICK, L.J.; WILTBANK, M.C. Emergence and deviation of follicle during the development of follicular waves in cattle. **Theriogenology**, v. 48, n.1, p. 75-87, 1997.

GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C.; FRICKE, P.M.; GIBBONS, J.R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 55, n.6, p. 1187-1194, 1996.

GINTHER, O.J.; GONG, J.G.; BRAMLEY, T.A.; PETERS, A.R.; WEBB, R. Effects of chronic treatment with a potent gonadotropin-releasing hormone agonist on peripheral concentrations of FSH e LH, and ovarian function in heifers. **Journals of Reproduction & Fertility**, v. 105, n.2, p. 263-270, 1995.

GIROTTI, S.; FERRI, E.; GHINI, S.; RODA, A.; PASINI, P.; CARREA, G.; BOVARA, R.; LODI, S.; LASI, G.; NAVARRO, J.; RAUCH, P. **Quimica Analitica**, V.16, p.111, 1997.

GONG, J.G.; CAMPBELL, B.K.; BRAMLEY, T.A.; GUTERREZ, C.G.; PETERS, A.R.; WEBB, R. Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. **Biology of Reproduction**, v. 55, n.1, p. 68-74, 1996.

GOODMAN, R.L.; KARSH, F.J. Pulsatility secretion luteinizing hormone: differential suppression by ovarian steroids. **Endocrinology**, v.107, n.5, p. 1286-1290, 1980.

HAFEZ, E.S.E. Ciclos reprodutivos In: HAFEZ, E.S.E. (Ed.) **Reprodução Animal**. São Paulo: Manole, 7ed., p.55-67, 2004.

HAFEZ, E.S.E. Ciclos reprodutivos In: HAFEZ, E.S.E. (Ed.) **Reprodução Animal**. São Paulo: Manole, 7ed., p.160a, 2004.

HAFEZ, E.S.E. Ciclos reprodutivos In: HAFEZ, E.S.E. (Ed.) **Reprodução Animal**. São Paulo: Manole, 7ed., p.295b, 2004.

HAMILTON, S.A.; XU, Z.Z.; KIEBORZ, K.R.; YONGQUIST, R.S.; GARVERICK, H.A. Relationship between ovarian follicular dynamics and follicle-stimulating hormone levels during the bovine estrous cycle. **Journal of Animal Science**, v. 70, suppl. 1, p. 261-323, 1992.

HANSEL, W.; CONVEY, E.M. Physiology of the estrus cycle. **Journal of Animal Science**, v.57, n.2, p. 404-423, 1983.

HAUGER, R.L.; KARSH, F.J; FOSTER, D.L. A new concept for the control of estrus cycle in the ewe on the temporal relationship between luteinizing hormone estradiol and progesterone in peripheral serum and evidence that progesterone inhibits tonic LH secretions. **Endocrinology**, v. 101, n.3, p. 807-817, 1977.

HAWCROFT, D.; HECTOR, T.; ROWELL, F.; "**Quantitative Bioassay**", Wiley, New York, p. 91, 1987.

HORÁČEK, J.; SKLADAL, P. Anal. **Analytica Chimica Acta**, V. 347, p. 43, 1997,

HORNEY, B. S. et al. Evaluation of an automated, homogeneous enzyme immunoassay for serum thyroxin measurement in dog and cat serum. **Veterinary Clinical Pathology**, 28(1):20-28, 1999.

HUNTER, R.H.F.; WILMUT, I. Sperm transport in the cow: peri-ovulatory redistribution of viable cells within the oviduct. **Reproduction Nutrition Development**, v.24, n.5A, p. 597-608, 1984.

IRELAND, J.J.; MIHM, M.; AUSTIN, E.; DISKIN, M.G.; ROCHE, J.F. Historical perspective of turnover of dominant follicles during the bovine estrous cycle: key concepts, studies, advancements, and terms. **J. Dairy Sci**, v.83, p.1648-1658, 2000.

JACKSON, T. M.; EKINS, R.P. **Journal Immunology Methods**, V.87, p. 13-18, 1986.

JIMÉNEZ, A.M.; NAVAS, M.J.; **Critical Reviews Analytical Chemistry**, v. 27, p. 291, 1997.

JONES, G.; WORTBERG, M.; ROCKE, D. M.; HAMMOCK, B. D. **ACS Symposium Series**. V.637, p.331-337, 1997.

KAMIDATE, T.; WATANABE, H. Peroxidase-catalyzed luminol chemiluminescence method for the determination of glutathione. **Talanta**, v.43, p.1733-1738, 1996.

KANEKO, H.; TERADA, T.; TAYA, K.; WATWNABE, G.; SASAMOTO, S.; HASEGAWAY, Y.; IGARASHI, M. Ovarian follicular dynamics and concentrations of estradiol-17-beta, progesterone, luteinizing hormone and follicle stimulating hormone during preovulatory phase of the oestrus cycle in the cow. **Reproduction Fertility Development**, v. 3, n.5, p. 529-535, 1991.

KARSCH, F.J. Central actions of ovarian steroids in feedback regulation of pulsatile secretion of luteinizing hormone. **Annual Review of Physiology**, v. 49, p.365-382, 1987.

KASTELIC, J.P.; KNOPF, L.; GINTHER, O.J. Effect of day of prostaglandin F_{2α} treatment on selection and development of the ovulatory follicle in heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 23, n.3, p. 169-180, 1990.

KEMPE, M. **Analytical Chemistry**, v.68, p.1948,1996.

KESNER, J.S.; CONVEY, E.M; ANDEERSOM, C.R. Evidence that Estradiol induced the preovulatory LH surge in cattle by increasing pituitary sensitivity to LHRH and then increasing LHRH release. **Endocrinology**, v. 108, n.5, p. 1386-1391, 1981.

KOHEN, F.; DE BOEVER, J.; KIM, J.B. Surface Chemiluminescence Immunoassay for free T4. **Clinical Chemistry**, Abstract, v.34, p.1216, 1988a

KRICKA, L.J. **Pure applied chem.**, v. 68, p. 1825, 1996

KRISHNAN, R.; GHINDILIS, A.L.; ATANASOV, P.; WILKINS, E. **Analytical Letters**, v. 29, p. 2615, 1996.

LAURINO, J.P.; HALLETT, J.; KIESSLING, L.S.; BENSON, M; PEELLETIER, T.; KUHN, C. **Annals of Clinical Laboratory Science**, V. 27, p. 340, 1997.

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

LOPES, P.R.; FURTADO, P.V.; SOUZA, R.H.F.A.; OLIVEIRA, C.A. Importância e metodologias para mensuração dos esteroides sexuais em ruminantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.39, n.3, p.322-328, 2015.

MARTIN, O.; FRIGGENS, N.C.; DUPONT, J.; SALVETTI, P.; FRERET, S.; RAME, C.; ELLIS, S.; GATIEN, J.; DISENHAUS, C.; BLANC, F. Data-derived profiles with corepresentation of progesterone, estradiol, LH, and FSH dynamics during the bovine estrous cycle. **Theriogenology**, v. 79, 331-343, 2013.

MARTIN, J.K.; LAYTE, K.; ASLAM, M. Enhanced luminescence immunoassay for free T4. **Clinical Chemistry**, Abstract, v.34, p.1216, 1988a ..

MERCADER, J.V.; MONTOYA, A. **Analytica Chimica Acta.**, p. 347. 1997.

MIHM, M.; DISKIN, M.G.; ROCHE, J.F. Regulation of follicle wave growth in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v.31, n.3, p. 531-538, 1996.

MIHM, M.; AUSTIN, E.J. The final stages of dominant follicle selection in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, n.1, p. 155-166, 2002.

MIHM, M.; CROWE, M.A.; KNIGHT, P.G.; AUSTIN, R.J. Follicle wave growth in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v.37, n.4, p. 191-200, 2002.

MOTTOLA, H.A.; **Kinetics Aspects of Analytical Chemistry**, John Wiley & Sons: New York, 1988.

MOURA, R.A. **Técnicas de laboratório**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2001.

NAVAS, M.J.; JIMÉNEZ, A. M.; **Critical Reviews Analytical Chemistry**, v. 30, p. 153, 2000.

NORIS ROA, A.; LANARES, T.; BARRIOS, D.; DE ROLO, M.A.; TAMASAUKAS, R. Determinacion de progesterona plasmática por el método ELISA em receptoras de embriones bovinos. **Revista Científica, FCV-LUZ**, V.11, n.2, p. 133-138, 1997.

OSHASHI, E.; YAGI, K.; UZUKA, Y.; TANABE, S.; SARASHINA, T.; ISHIDA, T. Seasonal changes in serum total thyroxine, free thyroxine and canine thyroid-stimulating hormone in clinically healthy beagles in Hokkaido. **Journal of Veterinary Medicine and Science**, V. 63, n.11, p.1241-1243, 2001.

PARKER, K.I.; ROBERTSON, D.M.; GROOME, N.P.; MACMILLAN, K.L. Plasma concentrations of Inhibin A and follicle-stimulating hormone differ between heifers with two or three waves of ovarian follicular development in a single estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v.68, 822-828, 2007.

PIZZAGLI, M.; SERIO, M. On-Line computer analysis of the kinetics of chemiluminescence reactions: application to luminescent immunoassays. **Methods Enzymology**, v.133, p.420-435,1986.

PORSTMANN, T.; KIESSING, S.T. Enzyme immunoassay techniques. An Overview. **Journal Immunology Methods**, v.150, n.1-2, p. 5-21, 1992.

PRICE, C.A.; WEBB, R. Steroid control of gonadotropin secretion and ovarian function in heifers. **Endocrinology**, v.122, n.5, p. 222-231, 1988.

PURCHADES, R.; MAQUIEIRA, A.; ATIENZA, J. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, V. 23, p. 301, 1992.

RAHE, C.H.; OWENS, R.E.; FLEEGER, J.L.; NEWTON, H.J.; HARMS, P.G. Patterns of luteinizing hormone in the cycling cow dependence upon period of the cycle. **Endocrinology**, v. 107, n.2, 498-503, 1980.

RICHARDSON, A.P.; KIM, J.B.; BERNARD, G.J. ET AL., Chemiluminescence immunoassay of plasma progesterone with progesterone-acridinium ester used as the labeled antigen. **Chemical Chemistry**, v.31, n.10, p.455-465, 1985.

ROBARDS, K.; WORSFOLD, P.J.; **Analytica Chimica Acta** v. 266, p. 147, 1992.

ROBINSON, T.J.; SHELTON, J.N. Reproduction in Cattle In: CUPPS, P.T. Reproduction in Domestic animals. 4. ed. San Diego: **Academic Press**, p.445-470, 1991.

SANTANDREU, M.; SOLE, S.; FABREGAS, E.; ALEGRET, S. **Biosensors & Bioelectronics**, v.13, p.7-15, 1998.

SARTORELLI, E.S.; CARVALHO, L.M.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J.; BARROS, C.M. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and heifers. **Theriogenology**, v.63, p.2382-2394, 2005.

SARTORI, R.; GIMENES, L.; MONTEIRO JR, P.L.J.; MELO, L.F.; BARUSELLI, P.S.; BASTOS, M.R. Metabolic and endocrine differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* females that impact interaction of nutrition with reproduction. **Theriogenology**, v.86, p.32-40, 2016.

SCHONEMANN, H.A.; HUMPREY, W.D.; CROWDER, M.E.; NETT, T.M.; REEVES, J.J. Pituitary luteinizing hormone releasing receptors in ovariectomized heifers after challenge with ovarian steroids. **Biology of Reproduction**, v.32, n.3, p. 574-583, 1985.

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

SHEN, H.; ASPINWALL, C. A.; KENNEDY, R.T. **Journal of Chromatography B**, v. 689, p. 295, 1997.

SHERRY, J.P., **Critical Reviews in Analytical chemistry**, v.23, p.217, 1992.

SILVA, A.R.R.; REYES, A. de los; GAMBARINI, M.L.; RUMPF, R.; OLIVEIRA, C.C.; OLIVEIRA FILHO, B.D. Estudo da dinâmica folicular em novilhas da raça Gir através de ultrassonografia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.25, n.2, p. 130-132, 2001.

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

SINGH, A. K.; JIANAG, Y.; WHITE, T.; SASSOVA, D. Validation of nonradioactive chemiluminescent immunoassay methods for analysis of thyroxin and cortisol in blood samples obtained from dogs, cats and horses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 9:261-268, 1997.

SKELLEY, D.S.; BROWN, L.P.; BESCH, P.K. Radioimmunoassay. **Clinical Chemistry**, v. 19, n.2, p. 146-186, 1973.

SKLADAL, P. **Electroanalysis**, v. 9, p. 737, 1997,

SUNDERLAND, S.J.; CROWE, M.A.; BOLAND, M.P; ROCHE, J.F.; IRELAND, J.J. Selection, dominance and atresia of follicles during the estrous cycle of heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 101, n.3, p. 547-555, 1994.

STUMPF, T.T.; DAY, M.L.; WOLFE, M.W.; CLUTTER, A.C.; STOTTS, J.A.; WOLFE, P.L.; KITTOCK, R.J.; KINDER, J.E. Effects of estradiol on secretion of luteinizing hormone during the follicular phase of the bovine estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v.41, n.1, p. 91, 1989.

SZURDOKI, F.; KIDO, H.; HAMMOCK, B.D. **ACS Symposium. Series**, v. 657, p. 38, 1997

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

TSUJI, A.; MAEDA, M.; ARAKAWA, H. **Analytical Sciences**., v. 5, p. 497, 1989.

VIEIRA, A.B.; CASTRO, M.C.N.; FREIRE, I.M.A.; COELHO, M.J.; ALENCAR, N.X.; SOARES, A.M.B. Dosagem de Tiroxina Total (T4 total) sérica pelo método de quimioluminescência em gatos clinicamente sadios. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. 47 (3): 224-230, 2010.

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

WEBB, R. et al. Factors affecting folliculogenesis in ruminants. **Animal Science**, v.68, p.257-284, 1999.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P.C.; GONG, J.G.; ARMSTRONG, D.G. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. **Journal of Animal Science**, v.82, p.63-74, 2004.

WEEKS, I. Chemiluminescence Immunoassay. In: Price, C.P. **Principles and practice of immunoassay**. 2th ed. Londres: Mac-Milan, Chapter 17, p.427-442, 1997.

WILTBANK, M.C.; GUMEN, A.; SARTORI, R. Physiological classification of anovulatory conditions cattle. **Theriogenology**, v.57, p.21-52, 2002.

WISHART, D.F. Observations on the estrous cycle of the Friesan Heifers, **Veterinary Record**, v.90, n.21, p. 595-597, 1972.

WORSFOLD, P.J.; YAN, B.; **Analytical Chimica Acta**, v. 246, p. 447, 1991.

WRIGHT, P.J.; MALMO, J. Pharmacologic manipulation of fertility. The Veterinary Clinics Of North America. **Food Animal Practice**, v. 8, n.1, p. 57-89, 1992.

YALOW, R. S.; BERSON, S. A. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. **Nature**, 184(Suppl 21):1648-1649, 1959.

YONG, C.R. Structural Requiriments for Immunogenety and Antigenicity, in: Atassi, M.Z.; Van Oss, C.J.; Absolom, D.R. "**Molecular Immunology**" eds., Marcel Decker, New York, 1984.

5. Objetivos

5.1. Objetivo Geral

Avaliar a capacidade analítica da quimioluminescência para utilização nas dosagens das concentrações de hormônios na avaliação da fertilidade de novilhas bovinas holandesas, como ferramenta no auxílio das diversas etapas do ciclo reprodutivo.

5.2. Objetivos específicos

5.2.1. Progesterona (P4)

Avaliar a capacidade analítica da quimioluminescência como método alternativo para a dosagem das concentrações de progesterona (P4) em novilhas bovinas holandesas, correlacionando estas concentrações com o diâmetro do corpo lúteo (CL).

5.2.2. Hormônio Luteinizante (LH)

Avaliar a capacidade analítica da quimioluminescência como método alternativo para a dosagem das concentrações do hormônio Luteinizante (LH) em novilhas bovinas holandesas, correlacionando estas concentrações com o diâmetro do folículo dominante (FD).

5.2.3. Hormônio Folículo estimulante (FSH)

Avaliar a capacidade analítica da quimioluminescência como método alternativo para a dosagem das concentrações do hormônio folículo estimulante (FSH), em novilhas bovinas holandesas, correlacionando estas concentrações com o diâmetro do folículo dominante (FD).

CAPÍTULO I

USE OF CHEMILUMINESCENCE TO DETERMINE THE CONCENTRATIONS OF SERUM PROGESTERONE IN BOVINES

UTILIZAÇÃO DA QUIMIOLUMINESCÊNCIA PARA DETERMINAR AS CONCENTRAÇÕES DE PROGESTERONA SÉRICA EM BOVINOS

ABSTRACT

The objective was to use chemiluminescence as an analytical method to correlate the concentration serum progesterone with the development of the corpus luteum and with the stages of the estrous cycle in cattle. Nine cycling Holstein heifers were used in the experiment and submitted to daily blood sampling and ultrasonography. Blood collections were performed daily in the period between March and April and the hormonal dosages in December. The hormonal values were defined by indirect chemiluminescence in heterogeneous phase and reading in glow phase (stable light emission) and correlated with the diameters of the corpora lutea (mm), obtained by transrectal ultrasonography. The assay imprecision test indicated a coefficient of variation of 6,16%. Progesterone concentrations were positively correlated ($R^2 = 0,22$) with the corpus luteum diameter and the quadratic relation was the best fit for the data. The patterns of progesterone concentrations were consistent with the occurrence of estrous cycle stages parallel to the standards established with the RIA method. This trial demonstrated that the chemiluminescence method is suitable for the measurement of progesterone in bovines, as well as, a methodology capable of defining stages of the estrous cycle, of easy execution and low cost. More studies using this

methodology should be carried out for its implementation as an alternative for hormonal determination techniques.

Index terms: Corpus luteum; progesterone concentration; steroid assay

RESUMO

O objetivo foi utilizar a quimioluminescência, como método analítico para correlacionar a concentração sérica de progesterona com o desenvolvimento do corpo lúteo e com as fases do ciclo estral em bovinos. Foram utilizadas 9 novilhas nulíparas Holandes, cíclicando, submetidas a coletas diárias de sangue. As coletas foram realizadas diariamente no período de março/abril e as dosagens hormonais em dezembro. Os valores hormonais foram definidos pela quimioluminescência indireta em fase heterogênea e leitura em fase *glow* (emissão de luz estável), e correlacionadas com os diâmetros dos corpos lúteos (mm), obtidos por ultrassonografia transretal. O teste de imprecisão do ensaio indicou um coeficiente de variação de 6,16%. As concentrações de progesterona foram positivamente correlacionadas ($R^2=0,22$) com o diâmetro do corpo lúteo, sendo a relação quadrática a que melhor se ajustou aos dados. Os padrões das concentrações de progesterona foram condizentes com a ocorrência de ciclos estrais de forma paralela aos padrões estabelecidos com o radioimunoensaio. Esta pesquisa demonstrou que o método de quimioluminescência, pode ser utilizado para a mensuração da progesterona, sendo uma metodologia de fácil execução e baixo custo. Mais estudos utilizando essa metodologia deverão ser realizados para a adoção da mesma como alternativa em laboratórios de dosagens hormonais.

Termos para indexação: Corpo lúteo; concentração de progesterona; ensaio de esteroides

INTRODUCTION

The adoption of alternative methodologies for evaluating the hormonal profile of cattle in Brazil in an economically feasible way and with reliable results is a crucial point for advances that allow the improvement of the reproductive efficiency of the herds. In addition to the direct evaluation of animals in field situations, new methodologies are necessary for research which should help to understand the physiological reproductive phenomena, especially under the not so well known conditions of Brazilian cattle (Baruselli et al., 2007; Simplicio et al., 2007).

Non-radioactive techniques, such as chemiluminescent immuno enzymatic assay have been disseminated in the last ten years and are an alternative to the use of radioimmunoassay (RIA). Its cost is lower and its availability greater, since it is commonly used in human laboratories. This technique has limits of detection (analytical sensitivity) comparable or superior to RIA and few validations have been performed, among them, its use in cats (Singh et al., 1997; Horney et al., 1999). In this sense, the chemiluminescence method has, in essence, the requirements to overcome traditional methods of hormonal determination. Among these characteristics are the automation, which minimizes human errors and the non-use of radioactivity as in RIA (Lopes et al., 2015).

Progesterone or P4 is a steroid for which assays are well established (Niswender et al., 2000) and its determination has the greatest potential for field and laboratory applicability. The determination of P4 provides concrete subsidies to evaluate the viability of the corpus luteum (Blavy et al., 2016), both in cyclic phase and in gestation phase, especially in its early stages in cattle.

There are no validated results for chemiluminescence hormone determination for most domestic species, and the validations that exist are focused on RIA techniques. The RIA was initially developed for insulin determination by Yallow and Berson in 1959 and has been gradually replaced by other immunological methods, such as those using fluorogenic, chemiluminogenic and enzymatic compounds as markers (Steinbeck and Wyner, 1993; Moura et al., 2001).

The methodologies used to determine steroids have been improving according to the more recent technological advances, with the appearance of increasingly sensitive and specific tests, improving the precision of the results. Several techniques have been developed, but each technique has advantages and limitations (Gil et al., 1999; Vignali, 2000). The RIA utilization trends, at the end of the last century, pointed to the development of faster tests, the use of non-radioactive detection systems and the development of multi-parameter methods of analysis (Gil et al., 1999).

Several studies have demonstrated the efficiency of chemiluminescence assays, when compared to other methodologies: Armbruster, Jirinzu and Williams (1988), Bigos, MacLean and Butler (1989), Bonini et al. (1988) and Martin, Layte and Aslam (1988) for Thyroxine; Salinas, Formulare and Worthy (1988), for thyroid hormones; Kohen, De Boever and Kim (1986), for estradiol and progesterone; Martin, Layte and Aslam (1988) for cortisol; Armbruster, Jirinzu and Williams (1988) and Barlow et al. (1989) for ferritin.

The absence of reference values for bovine hormone concentrations in Brazil may be one of the contributing factors to the scarcity of data that lead to the inefficiency of the techniques that depend on them (Vieira et al., 2010). The reference values used in Brazil are imported from countries such as the United States, which may not reflect the Brazilian reality (Oshashi, et al., 2001), hence the need to establish region-specific (country) reference values

for the hormones evaluated. According to some commercial laboratories, which perform the hormonal dosages for veterinary hormones, the reference values for P4 are quoted by chemiluminescence, but do not mention any validation procedure to obtain these values, therefore, they are values consolidated by use and not validated.

The objective is to validate the chemiluminescence method to measure progesterone in cycling Holstein heifers and to establish correlations with the diameter of the corpus luteum and the phases of the estrous cycle.

MATERIAL AND METHODS

Animals and local

This study was approved by the ethical committee for use of animals (CEUA)/UFVB) process number 03/2015 of March 17, 2015.

This experiment was carried out at the Experimental Unit of Dairy Cattle, Department of Animal Science, Federal University of Viçosa (UFV), Viçosa - MG, Brazil, coordinates: altitude 660 meters, south latitude 42°, 52 ', 57.02' ' and west longitude of Greenwich 20°, 45 ', 16,3 ", average annual temperature 20,9°C. Nine Holstein healthy, cyclic and between two years-old-heifers, between April and May 2015.

All heifers were maintained in a free stall, fed according to animal category and milk production. A total mix comprising corn silage, concentrate based on soybean, and mineral mix were fed twice a day. Water was provided *ad libitum*.

Blood sample collection and preparation

After individual containment in a squeeze chute, five milliliters of blood were collected from the jugular or coccygeal vein via a serum vacutainer system (Sarsted, GDR). Blood samples were taken daily for a minimum of 19 days and a maximum of 45 days, depending on the animal. Samples were conditioned in isothermal iceboxes and sent to the laboratory for processing. Samples were centrifuged at 700G for 10 minutes and when necessary, repeated. Serum samples were packed in 1.5 ml plastic tubes (Eppendorf®) and stored in a freezer at -18°C until the day of the hormone assay.

Evaluations of follicular dynamics and corpora lutea

Follicular and corpora lutea dynamics were evaluated daily by transrectal B-mode ultrasonography (Mindray). Follicles > 3 mm were mapped, and follicular waves defined. Dominant and subdominant follicles were mapped, and their diameter recorded until ovulation or atresia. The diameter of the corpus luteum, and the total number of follicles in each ovary were recorded.

Progesterone assay

Laboratorial procedures were performed at the Animal Physiological Reproduction Laboratory of the Department of Animal Science, at UFV. After thawing, 400 µL of serum were used for progesterone determination. An automated glow phase chemiluminescent immunoassay was used (Access 2 - Immunoassay Diagnostics, Beckman Coulter, ScanLab Diagnostica Ltda, Belo Horizonte, Minas Gerais). Samples were conditioned in cups and

measured by indirect chemiluminescence in heterogeneous phase, using the alkaline phosphatase enzyme as a marker and the chemiluminescent substrate dioxetane lauryl phosphate (Beckman Coulter, Inc.).

The chemiluminescence technique used the competitive assay, where the progesterone competed with the alkaline phosphatase (PAL) enzyme forming a P4 labeled conjugate, which uses a rabbit polyclonal antibody. The solid support for the reaction was an antibody-sensitized iron (Fe) coated particle, goat anti-P4, with binding sites available for both, the conjugate and the sample P4. The amount of analyte (P4 sample) is inversely proportional to the amount of light generated by the system, which uses as a trigger of the reaction the dioxetane phosphate substrate that undergoes the action of the alkaline phosphatase enzyme present in the conjugate, the substrate-enzyme complex is separated by washing the Ag-Ac complex (AntiP4 of the solid support + P4 of the sample or P4-conjugated with enzyme), the amount of light generated is captured by the luminometer and the relative unit of light (RLU) is plotted in the YY of a graph whose XX is the concentration of P4 in ng/mL

The imprecision tests were performed for each assay using an intra-assay calculation for P4 concentrations and the universal commercial control, Lyphocheck Immunoassay plus (Bio Rad Laboratories®). Level 1 was used to calculate the coefficient of intra-assay variation and the level 2 for the inter-assay coefficients on consecutive days.

Statistical analyses

Corpus luteum and progesterone data were submitted to regression analysis, test Shapiro-Wilk following the simple linear model $\hat{Y}_i = B_1X_i + e_i$, where Y_i is the dependent

variable response (progesterone concentration), X_i (corpus luteum diameter) the independent variable and random error, according to the REG procedure (SAS®). Data from progesterone concentrations over time were submitted to analysis of variance in a repeated measure model by the GLIMMIX procedure of SAS®.

RESULTS AND DISCUSSION

The frequency distribution of progesterone concentrations ($n= 334$) followed the Poisson distribution, with a mean of 6.36 ± 3.37 ng/mL, ranging from 0.01 and 40 ng/mL (Figure 1). This distribution and values are similar to those observed in the literature with RIA for cattle (Adeyemo and Heath, 1980; Badinga et al., 1994; Jiménez et al., 1988; Sartori et al., 2016).

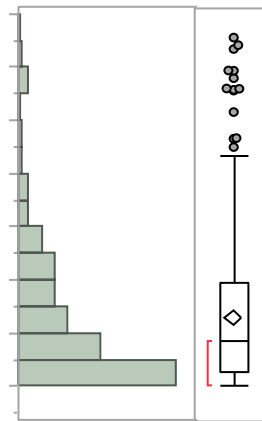


Figure 01: Frequency distribution of progesterone concentrations. The Y axis is the P4 concentrations in ng/mL and the X axis is the number of dosages in each concentration range ($n = 334$).

Progesterone concentrations were positively correlated ($p<0.05$) with corpus luteum diameter (Figure 2). The curve that best described the association between the CL diameter and the P4 concentration was quadratic. For diameters greater than 25 mm, there was a slight

drop in the P4 concentrations. This correlation was demonstrated along the diestrus during random estrous cycles, and these results are consistent with other studies in cattle performed with radioimmunoassay (Adeyemo and Heath, 1980; Badinga et al., 1994; Borges et al., 2003; Jiménez et al., 1988; Sartori et al., 2016). The correlation found in the present work was $r^2 = 0,22$, it was inferior to the order, due to the inclusion of animal data for that of the period considered, since the data were all considered. These results also corroborate the hypothesis that chemiluminescence, as applied in this study, can be used to determine the concentration of progesterone in cattle, being indicative of the functionality of the corpus luteum. Similar results with chemiluminescence, to our knowledge, have not yet been reported in the literature for relevant comparisons.

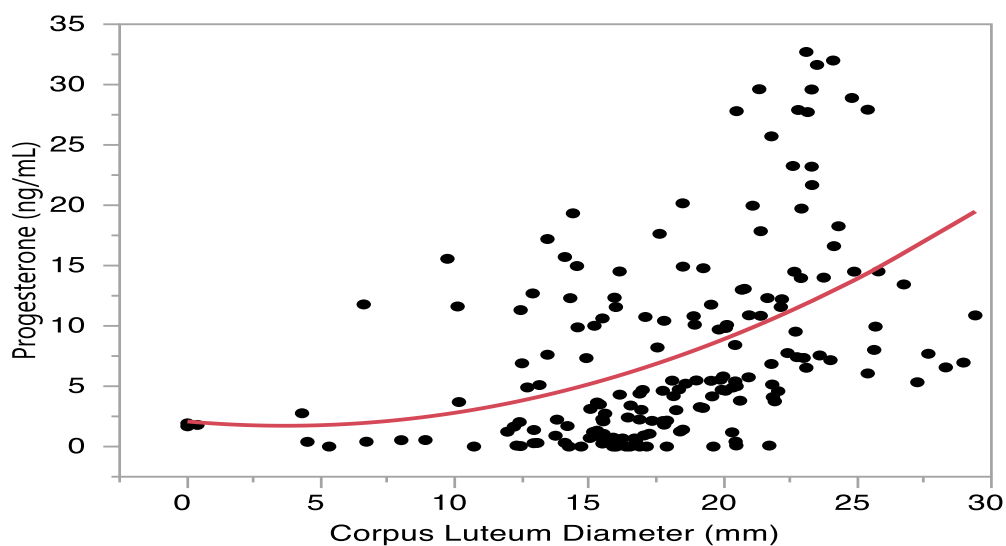


Figure2: Progesterone concentrations and diameter of the corpus luteum by ultrasonography at random times during the diestrus, in Holandes cattle, n=334. ($R^2=0.22$; $p<0.0001$) $\{P4 (ng/mL) = -6.363924 + 0.755459 * Diameter (mm) + 0.0268106 * (Diameter (mm) - 17.7511)^2\}$

The individual variations of progesterone concentration over consecutive collections for 17 days allow the characterization of the phases of the estrous cycle of the heifers (Table 1).

Table 1: P4 Concentration and CL diameter along sampling days in cow 3019

Sampling day	Corpus luteum diameter (mm)	Progesterone(ng/mL)	Estrous cyclephase Probably
09	14.93	7.33	
11	18.85	10.81	Initial Metestrous
12	16.02	12.34	
13	19.24	15.45	
14	21.45	17.58	
15	21.82	25.71	
17	21.14	19.96	
18	20.52	22.80	Diestrous
20	22.81	27.89	
21	24.84	28.90	
23	24.05	31.90	
24	23.50	31.63	
25	24.50	18.26	Luteolysis
26	18.10	5.43	
27	17.00	4.70	Proestrous
28	15.55	2.73	
29	Non available	2.76	Estrous
Mean	20.04	14.56	

Initially, a steady increase in P4 concentrations was observed along sampling days, with values ranging from 7.33 ng/mL up to 31.90 ng/mL and simultaneous growth of the corpus luteum, with measurements varying from 14.93 to 24.84 mm (table 1). There were decreases in P4 concentrations to 2.76 ng/mL, coinciding with a decrease in the diameter of the corpus luteum to undetectable values, as a result of luteolysis. These results are in agreement with Agarwal et al. (1977), for Zebu heifers, which presented during estrus, peak P4 concentrations of 2.3 ng/mL, measured by RIA.

Progesterone concentrations during the collection period were consistent with the occurrence of one or more estrous cycles (Figure 3). Serum progesterone concentrations varied during the normal estrous cycle with concentrations above and below 1.0 ng/mL, suggesting the presence of a functional corpus luteum and its decline and eventual absence during proestrus and estrus, respectively. The dynamics of P4 concentrations were consistently observed in the animal profiles, similar to those extensively observed with RIA

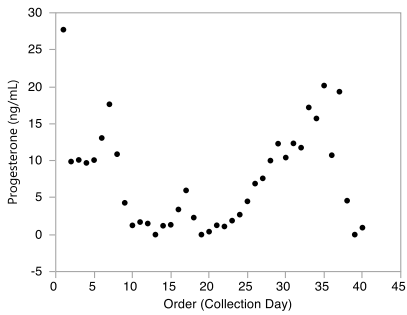
in the literature (Badinga et al., 1994, Adeyemo and Heath, 1980 and Jiménez et al., 1988). With the RIA methodology, concentrations of P4 around 16.0 ng/mL were observed for taurine and zebu heifers (Sartori et al., 2016) on the tenth day of the estrous cycle, and, according to the same authors, these concentrations are maintained high until the beginning of the corpus luteum regression.

In the present work, values of P4 concentrations lower than 0.10 ng/mL were observed, similar to the results obtained by Santiago et al. (2001), who worked with the hormonal profile of progesterone in confined heifers during estrous. They observed on the day of estrus (D0) concentrations below 1.0 ng/mL in normal estrous cycles (21 days) and long cycles (more than 25 days). Sartori et al. (2016) observed concentrations similar to those of the present study in the D7 of 2.8 ng/mL and D14 of 4.6 ng/mL, for *Bos taurus* and in 4.6 ng/mL and for *Bos indicus*, attesting the efficiency of chemiluminescence. Santiago et al. (2001) obtained values of P4 on the third day of the estrous cycle, lower than those obtained in the present study, which shows that the same method may present variations depending on the laboratory or uncontrolled factors.

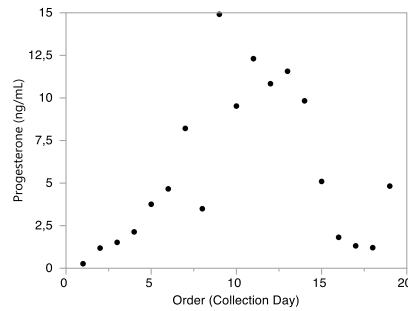
In Nelore heifers, mean P4 concentrations of 7.5 ng/mL were recorded in RIA (Adeyemo and Heath, 1980; Jiménez et al., 1988), probably comparable to those of the present study, between 3.6 a 7.6 ng/mL (table 1; figure 3). However, Borges et al. (2003), studying the functionality of CL in zebu, reported concentrations of Gir and Nelore between 3.5 and 5.9 ng/mL evaluated by RIA between days 12 and 14 of the estrous cycle, similar to those of this cycle study.

The progesterone concentration dynamics demonstrated the likely occurrence of two estrous cycles (Figures 3A, E, F, G, H and I), as well as the occurrence of one estrous cycle (Figures 3B, C and D).

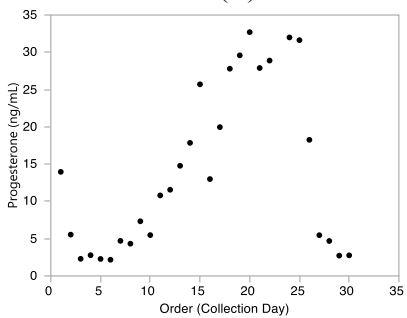
The maximum and minimum concentrations varied from animal to animal, with concentrations above 35 ng/mL (Figure 3) and near zero values. All animals had maximum concentrations higher than 8 ng/mL, the upper limit with the lowest concentration found in the analysis of all animals (Figure 3C).



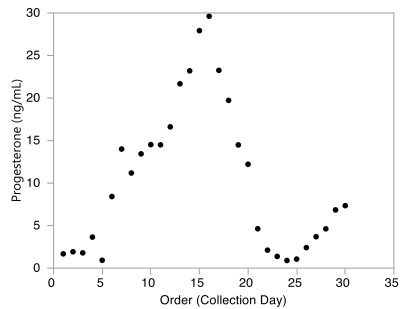
heifer 3019 (A)



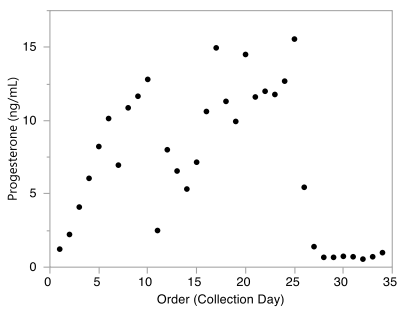
Heifer 3029 (B)



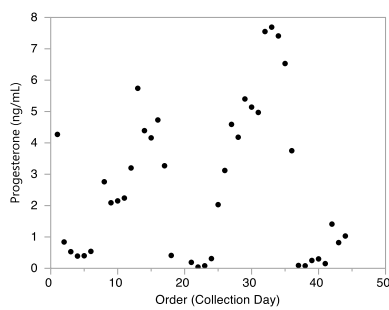
Heifer 3030 (C)



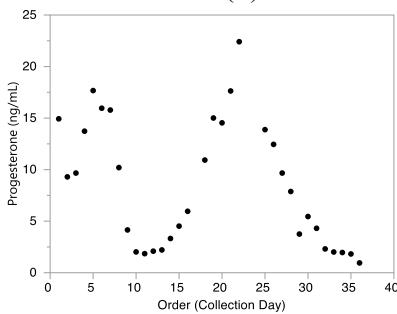
heifer 3036 (D)



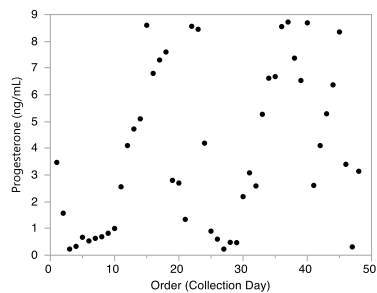
Heifer 3037 (E)



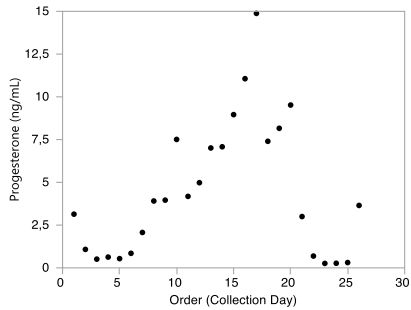
Heifer 3042 (F)



Heifer 3043 (G)



Heifer 3045 (H)



Heifer 4004 (I)

Figure 3: Individual concentrations in ng/mL of P4 throughout the collection days (Order).

In chemiluminescence, the analytical dynamic range capable of detecting progesterone values within the bovine estrous cycle variations included values lower than 1.00 and values higher than 20.0 ng/mL (table 1; figure 3), consistent with values reported previously (Adeyemo and Heath, 1980; Badinga et al., 1994; Jiménez et al., 1988; Santiago et al., 2001; Sartori et al., 2016).

The progesterone concentrations observed in the present work were higher than those reported with RIA (Adeyemo and Heath, 1980; Badinga et al., 1994; Jiménez et al., 1988; Santiago et al., 2001; Sartori et al., 2016). This discrepancy might be due to the physical nature of chemiluminescence that allows a greater number of units of measurement (sensitivity) that can differentiate samples in the milesimal digit. Very high RIA values require dilution, because they exceed the linearity of that method, which is not the case of chemiluminescence.

Although antibody specificity is lower in steroid hormones, these differences in chemiluminescence values for RIA should be considered, due to the specificity of the kit, the RIA used was that produced for cattle.

In the calibration curve the linearity was 40 ng/mL and the analytical sensitivity 0.02 ng/mL (Table 2). These values are similar to those obtained in another laboratory (Broes and

LeBlanc, 2014), which were 39.0 ng/mL and 0.1 ng/mL for linearity and analytical sensitivity, respectively. The results obtained in the present work are similar in terms of imprecision, those of the hormonal quantifications performed by RIA in the literature (Broes and LeBlanc, 2014) using commercial kits with intra-assay of 4.88% for the high control (20.67 ng/mL) and 7.92% for the low control (0.11 ng/mL).

Table 2: Mean, CV (%)* and standard error of the mean (SEM) for the imprecision calculation.

Replicate	Intra assay (ng/mL)	Inter assay 1	Inter assay2	Inter assay 3
1	1.07	10.19	9.84	9.61
2	1.25	10.16	9.49	9.72
3	1.03	10.29	10.19	9.80
4	1.19	10.13	10.16	10.13
5	1.07	9.61	10.29	9.85
6	1.06			
7	1.03			
8	1.14			
9	1.07			
10	1.12			
11	1.13			
12	1.16			
13	1.18			
14	1.15			
15	1.23			
SD	0.07	0.20	0.33	0.19
Mean	1.13	9.60	9.99	9.82
%CV	6.16	2.07	3.29	1.98

*CV= coefficient of variation

The analytical detection of chemiluminescence in the present study was similar to that reported by Borges et al. (2003), which obtained mean concentrations of 0.10 ng/mL compared to 0.02 ng/mL of the present study.

CONCLUSION

The determination of progesterone by chemiluminescence can be an alternative method in the monitoring and estimation of corpus luteum functionality and estrous cycle number within a set period of time and the approximate stages of the estrous cycles in which Holstein cattle may be in.

REFERENCES

ADEYEMO, O.; HEATH, E. Plasma progesterone concentration in *Bos taurus* and *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, 14(6):411-420, 1980.

AGARWAL, S.P.; RAHMAN, S.A.; LAUMAN, K.R. Studies on steroid hormones: Progesterone concentration in the blood serum of zebu cow during oestrous cycle. **Indian Journal Dairy Science**, 58(3):423-427.

ARMBRUSTER, D.A.; WILLIAMS, J.V. Enhanced luminescence immunoassays for the thyroxine (FT4) and ferritin. **Clinical Chemistry**, 34:1162, 1988. Abstract.

BADINGA, L. THATCHER, W.W.; WILCOX, C.J.; MORRIS, G.; ENTWISTLE, K.; WOLFENSON, D. Effect of season on follicular dynamics and plasma concentrations of estradiol-17 β , progesterone and luteinizing hormone in lactating Holstein heifers. **Theriogenology**, 42:1263-1274, 1994.

BARLOW, E. et al. A chemiluminescent immunoassay for the measurement of ferritin. **Clinical Chemistry**, 34:1162, 1988. Abstract.

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

BIGOS, S. T.; MACLEAN, J.; BUTLER, B. Comparison of serum free thyroxine measurements by chemiluminescence and equilibrium dialysis. **Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence**, 4:627-634, 1989.

BLAVY, P. DERKS, M.; HÖGLUND, J.K.; FRIGGENS, N.C. Overview of progesterone profiles in dairy heifers. **Theriogenology**, 86(4):1061-1071, 2016.

BONINI, P. A. et al. Free thyroxin estimation by enhanced luminescent immunometry. **Clinical Chemistry**, 34:1207, 1988. Abstract.

BORGES, A. M.; TORRES, C.A.A.; RUAS, J.R.M.; ROCHA JUNIOR, V.R.; CARVALHO, G.R. Desenvolvimento luteal e concentrações plasmáticas de progesterona em vacas das raças Gir e Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 32(2):276-283, 2003.

BROES, A.; LEBLANC, S. J. Comparison of commercial progesterone assays for evaluation of luteal status in dairy heifers. **The Canadian Veterinary Journal**, 55(6):582-584, 2014.

GIL, E. S.; KUBOTA, L. T.; YAMAMOTO, Y. I. Alguns aspectos imunológicos dos imunoensaios aplicados à química analítica. **Química Nova**, 22:874-881, 1999.

HORNEY, B. S. MACKENZIE, A.L.; BURTON, S.A.; OLEXSOM, D.W.; MITTON, K.L.; COTY, W.A.; RINE, S.G. Evaluation of an automated, homogeneous enzyme immunoassay for serum thyroxin measurement in dog and cat serum. **Veterinary Clinical Pathology**, 28(1):20-28, 1999.

JIMÉNEZ, F.; GALINA, C.S.; DUCHATEAU, A. Levels of LH, progesterone and estradiol-17 β during natural and PGF 2 α induced estrus in Indubrazil and Brown Swiss heifers in the tropics. **Animal Reproduction Science**, 16:199-206, 1988.

KOHEN, F.; DE BOEVER, J.; KIM, J. B. Surface chemiluminescent immunoassays of steroids. **Methods Enzymology**, 133:387, 1986. Abstract.

LOPES, P.R.; FURTADO, P.V.; SOUZA, R.H.F.A.; OLIVEIRA, C.A. Importância e metodologias para mensuração dos esteroides sexuais em ruminantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 39(3):322-328, 2015.

MARTIN, J. K.; LAYTE, K.; ASLAM, M. Enhanced luminescence immunoassay for free T4. **Clinical Chemistry**, 34:1216, 1988. Abstract.

MOURA, R. A. et al. **Técnicas de laboratório**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2001.

NISWENDER, G.D.; JUNGEL, J.L.; SILVA, J.P.; ROLLYSON, M.K.; MCLINTOSH, E.W. Mechanisms controlling the function and life span of corpus luteum. **American Physiological Society**, 80(1): 1-29, 2000.

OSHASHI, E.; YAGI, K.; UZUKA, Y.; TANABE, S.; SARASHINA, T.; ISHIDA, T. Seasonal changes in serum total thyroxine, free thyroxine and canine thyroid-stimulating hormone in clinically healthy beagles in Hokkaido. **Journal of Veterinary Medicine and Science**, 63(11):1241-1243, 2001.

SALINAS, R.; FAMULARE, A. J.; WORTHY, T. E. Evaluation of a chemiluminometric assay for intact parathyroid hormone (Intact PTH). **Clinical Chemistry**, 34: 1157, 1988. Abstract.

SANTIAGO, L. L.; TORRES, C.A.; URIBE-VELASQUEZ, F.; CECON, P.R.; NOGUEIRA, E.T. Plasma Progesterone Level during the Estrous Cycle in Nelore Heifers Confined with Two, Three and Four Waves of Follicular Growth. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 30(6):2017-2020, 2001.

SARTORI, R.; GIMENES, L.U.; MONTEIRO, P.L.JR.; MELO, L.F.; BARUSELLI, P.S.; BASTOS, M.R. Metabolic and endocrine differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* females that impact interaction of nutrition with reproduction. **Theriogenology**, 86:32-40, 2016.

SAS. **A Handbook of Statistical Analyses using SAS**. 2 ed. Boca Raton; London; New York; Washington, D.C., 2002. 351p.

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**, 31(2):234-246, 2007.

SINGH, A. K.; JIANAG, Y.; WHITE, T.; SASSOVA, D. Validation of nonradioactive chemiluminescent immunoassay methods for analysis of thyroxin and cortisol in blood samples obtained from dogs, cats and horses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 9:261-268, 1997.

STEINBECK, M. J.; WYNER, L. R. Immunoassay and Related Principles. In: ANDERSON, S. C.; COCKAYNE, S. **Clinical Chemistry**: concepts and applications. Philadelphia: HBJ International Edition; W. B. Saunders, p. 96-99, 1993.

VIEIRA, A. B.; CASTRO, M.C.N.; FREIRE, I.M.A.; ALENCAR, N.X.; SOARES, A.M.B. Dosagem de tiroxina total (T₄) sérica pelo método de quimioluminescência em gatos clinicamente sadios. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 47(3):224-230, 2010.

VIGNALI, D. A. A. Multiplexed particle-based flow cytometric assays. **Journal of Immunological Methods**, 243(1-2):243-255, 2000.

YALOW, R. S.; BERSON, S. A. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. **Nature**, 184(Suppl 21):1648-1649, 1959.

Capítulo II

USE OF CHEMILUMINESCENCE TO DETERMINE LUTEINIZING (LH) AND FOLLICLE STIMULATING HORMONE (FSH) CONCENTRATIONS IN BOVINE SERUM

UTILIZAÇÃO DA QUIMIOLUMINESCÊNCIA PARA DETERMINAR AS CONCENTRAÇÕES DOS HORMÔNIOS LUTEINIZANTE (LH) E FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH) NO SORO DE BOVINOS

ABSTRACT

The study examined the feasibility of chemiluminescence as an analytical method to determine the serum concentrations of LH and FSH during the estrous cycle in cattle. Nine cycling Holstein heifers were used in the experiment which were submitted to daily blood sampling. In the period between March and April 2015 and the hormones dosed in December. Hormonal concentrations were defined by indirect chemiluminescence in heterogeneous phase and reading in glow phase (stable light emission). The assay imprecision test indicated a coefficient of variation of 6,84% and 3,80 %. Mean concentrations of 0,34 and 16,23 mIU/mL (ranges 0,32 - 0,72, and 0,63 - 17,48) were observed for LH and FSH, respectively. The patterns of LH and FSH concentrations were consistent with the occurrence of estrous cycle stages. This research demonstrated that the chemiluminescence method is suitable for the measurement of LH and FSH. More studies using this methodology should be carried out for its implementation as an alternative for hormonal determination techniques in cattle.

Index terms: gonadotropins; cattle; Holstein.

RESUMO

O estudo examinou a viabilidade da quimiluminescência como uma alternativa ao radioimunoensaio (RIA) como um método analítico para determinar as concentrações séricas de LH e FSH durante o ciclo estral em bovinos. Nove novilhas holandesas ciclando, foram utilizadas no experimento submetidas à coleta de sangue diariamente. As coletas de sangue foram realizadas no período de março a abril e os hormônios dosados em dezembro. As concentrações hormonais foram definidas por quimiluminescência indireta em fase heterogênea e leitura em fase Glow (emissão de luz estável). O teste de imprecisão do ensaio indicou um coeficiente de variação de 6,84% e 3,80% e as concentrações médias de 0,34 e 16,23 mIU/mL (intervalos 0,32 - 0,72 e de 0,63 - 17,48) observadas para LH e FSH, respectivamente. Os padrões das concentrações de LH e FSH foram consistentes com a ocorrência de estágios do ciclo estral paralelamente aos padrões estabelecidos com o método RIA. Esta pesquisa demonstrou que o método de quimiluminescência é adequado para a mensuração de LH e FSH, bem como, uma metodologia de fácil execução e baixo custo. Mais estudos utilizando essa metodologia devem ser realizados para sua implementação como alternativa para técnicas de determinação hormonal em bovinos.

Termos para indexação: gonadotrofinas; gado; Holandesa.

INTRODUCTION

A major constraint for fixed time artificial insemination in dairy herds is estrous detection (Bisinoto and Santos, 2013), as well as, relatively low pregnancy rates compared to regular (artificial Insemination) (Colazo and Mapletoft, 2014). One way to improve assisted reproductive technology results in cattle is to define more precisely the hormonal status of each cow, especially those that fail to conceive. Gonadotropins such as LH and FSH play a major role in providing support for CL and follicular functionality to ensure the proper environment for the establishment of pregnancy (Bloch et al., 2006). Understanding the physiological reproductive phenomena, especially of heifers *Bos taurus* cattle is essential to improve reproductive indexes and must rely, in part, on hormonal data (Baruselli et al., 2007; Pawson et al., 2005; Simplicio et al., 2007).

However, apart from research, the determination of reproductive hormone profiles is rarely applied in field conditions. This is mostly due to the high cost of the most available hormone detection technologies, such as radio immune assay (RIA) and enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA). Chemiluminescence is a less expensive and non-radioactive methodology that may allow practioneers to access the hormone profile of problem heifers on a more routinely basis. Among these characteristics, automation minimizes human errors and the non-use of radioactivity as in RIA (Lopes et al., 2015).

Non-radioactive techniques, such as chemiluminescent immuno enzymatic assay have been disseminated in the last ten years and are an alternative to the use of RIA. Its cost is lower and its availability greater, since it is commonly used in human laboratories. This technique has limits of detection (analytical sensitivity) comparable or superior to RIA and

few validations have been performed, among them, its use in cats (Singh et al., 1997; Vieira et al., 2010).

There are no validated results for chemiluminescence hormone determination for most domestic species, and the validations that exist are focused on RIA techniques. The RIA was initially developed for insulin determination by Yallow and Berson in 1959 and has been gradually replaced by other immunological methods, such as those using fluorogenic, chemiluminogenic and enzymatic compounds as markers (Moura, 2001; Steinbeck and Wyner, 1993). Several techniques have been developed, but each one has advantages and limitations (Gil et al., 1999; Vignali, 2000). The RIA utilization trends, at the end of the last century, pointed to the development of faster tests, the use of non-radioactive detection systems and the development of multi-parameter methods of analysis (Gil et al., 1999).

The absence of reference values for bovine LH and FSH concentrations in Brazil may be one of the contributing factors to the scarcity of data that lead to the inefficiency of the techniques that depend on them (Vieira et al., 2010). The reference values used in Brazil are imported from countries such as the United States, which may not reflect the Brazilian reality (Oshashi, et al., 2001), hence the need to establish region-specific (country) reference values for the hormones evaluated. According to some commercial laboratories, which perform the hormonal dosages for veterinary hormones, the reference values for LH and FSH are quoted by chemiluminescence, but do not mention any validation procedures.

The challenge is to acquire and interpret information on gonadotropin profiles as much as possible within a realistic on farm protocol based on the P4 profile, since chemiluminescence has been proved to be well suited for animal steroid assays (Vázquez et al 2005). For that, the protocol should be based on daily (once a day) blood sampling, since shorter intervals of blood collection are not feasible under herd management.

We hypothesized that daily blood sampling at random stages of the estrous cycle is sufficient to identify estrous cycle phase and associated gonadotropin secretion patterns based on the progesterone profile.

The aim is to describe the chemiluminescence results for FSH and LH, using progesterone as the basis for establishing estrous cycle patterns in cyclic Holstein.

MATERIAL AND METHODS

Animals and local

This study was approved by the ethical commission for use of animals (CEUA)/UFV process number 03/2015 of March 17, 2015.

This experiment was carried out at the Experimental Unit of Dairy Cattle, Department of Animal Science, Federal University of Viçosa (UFV), Viçosa - MG, Brazil, coordinates: altitude 660 meters, south latitude 42°, 52 ' , 57.02' ' and west longitude of Greenwich 20°, 45 ' , 16,3 " , average annual temperature 20,9°C. Nine Holstein healthy, cyclic between one and two years-old-heifers, were used between April and May 2015.

All heifers were maintained in a free stall, fed according to animal category and milk production. A total mix comprising corn silage, concentrate based on soybean, and mineral mix was fed twice a day. Water was provided *ad libitum*.

Blood sample collection and preparation

After individual containment in a squeeze chute, five milliliters of blood were collected from the jugular or coccygeal vein via a serum system (Sarsted, GDR). Blood

samples were taken daily for a minimum of 19 days and a maximum of 45 days, depending on the animal. Days of collection were denominated "Order" in the results. Samples were conditioned in isothermal iceboxes and sent to the laboratory for processing. Samples were centrifuged at 700G for 10 minutes and when necessary, repeated. Serum samples were packed in 1.5 ml plastic tubes (Eppendorf®) and stored in a freezer at -18°C until the day of the hormone assay.

LH-FSH and Progesterone assays

Laboratorial procedures were performed at the Animal Physiological Reproduction Laboratory of the Department of Animal Science, at UFV. After thawing, 400 µL of serum were used for LH-FSH determination. An automated glow phase chemiluminescent immunoassay was used (Access 2® - Immunoassay Diagnostics, Beckman Coulter, USA). Samples were conditioned in cups and measured by indirect chemiluminescence in heterogeneous phase, using the alkaline phosphatase enzyme as a marker and the chemiluminescent substrate dioxetane lauryl phosphate (Beckman Coulter, Inc.).

The chemiluminescence technique used the competitive assay, where LH or FSH competed with the alkaline phosphatase (PAL) enzyme forming an LH or FSH labeled conjugate, which uses a rabbit polyclonal antibody. The solid support for the reaction was an antibody-sensitized iron (Fe) coated particle, goat anti-LH or FSH, with binding sites available for both, the conjugate and the sample LH or FSH. The amount of analyte (LH or FSH sample) is directly proportional to the amount of light generated by the system, which uses as a trigger of the reaction the dioxetane phosphate substrate that undergoes the action of the alkaline phosphatase enzyme present in the conjugate, the substrate-enzyme complex

is separated by washing the Ag-Ac complex (Anti LH or FSH of the solid support + LH or FSH of the sample or LH or FSH-conjugated with enzyme), the amount of light generated is captured by the luminometer and the relative unit of light (RLU) is plotted in the YY of a graph whose XX is the concentrations of LH and FSH in mIU/mL. The Progesterone assay was performed according to procedures described elsewhere (Patton et al., 2014). Results were converted by a multiplying factor of 6 based on WHO (1975) standards.

Estrous cycle definition

An estrous cycle was defined as P4 concentrations rising sustainably above 1 ng/mL during at least 16 to a maximum of 24 days before lowering below that value and remaining low for at least one day (Cushman et al., 2007). An LH or FSH peak was considered any increase above 2 standard deviation values above the for each average value throughout the predefined estrous cycle, based in P4. Patterns deviating from these parameters were considered as abnormal profiles.

LH Measurements

Overall LH mean concentrations were established for specific stages of the estrous cycle base on the progesterone profile throughout the estrous cycle, such that the four following peak classes were considered for analysis: 1) metestrus (progesterone <1ng/mL); 2) diestrus; 3) atypical and baseline (\leq mean + 1 standard deviation, during any phase of the cycle). Peak was defined as any increase greater than the overall mean plus two standard deviations (Herbison, 2016).

The imprecision tests were performed for each assay using an intra-assay calculation for LH and FSH concentrations and the universal commercial control, Lyphocheck Immunoassay plus (Bio Rad Laboratories®). Level 1 was used to calculate the coefficient of

intra-assay variation and the level 2 for the inter-assay coefficients on consecutive days.

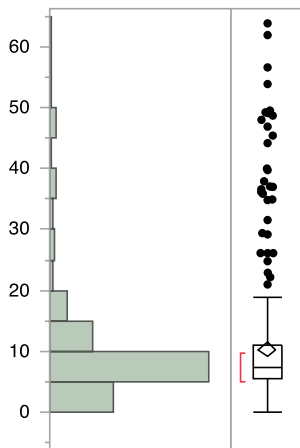
Statistical analyses

In a completely randomized model FSH and LH data were submitted to the Univariate procedure of SAS[®] to test normality via the Shapiro-Wilk test. Since they were non-normally distributed they were submitted to a non-parametric procedure. Data from LH and FSH concentrations over time were submitted to analysis of variance in a Mixed Model (SAS[®], 2002) where collection day, animal and type of LH pulse were fixed effects. Means were compared by Student's t pairwise. The level of statistical significance was set at 0.05%.

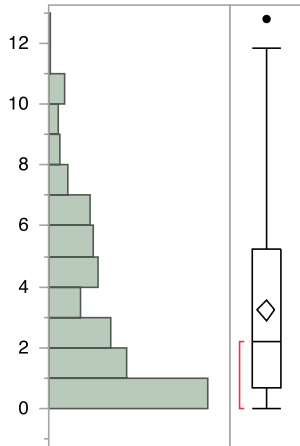
RESULTS AND DISCUSSION

Frequency distribution of LH and FSH concentrations

Serum concentrations (ng/mL) of LH and FSH throughout the sampling period were abnormally distributed (Shapiro-Wilk tests at $p < 0.0001$) and fitted a Poisson curve type (figure 1).



(A) LH



(B) FSH

Figure 01: Frequency distribution of LH (A) and FSH (B) concentrations. Y axis is the LH and FSH concentrations in mUI/mL and X axis is the number of dosages in each concentration range (n = 334).

Overall mean LH and FSH values

The mean LH concentration was 10.36 ± 0.61 ng/mL ($62,16 \pm 3,66$ mUI/mL) (range: $0.02 - 63.85$ ng/mL or $0,12 \pm 252,00$ mUI/mL) and the mode was 0.201 ng/mL ($1,206$ mUI/mL). Since sample days included those near the LH surge the mean value tend to increase and the peak value was within those reported as the LH surge peak (60.00 ng/mL ou 253 mUI/mL, linearity) for bovine (Abdul – Ahad; Gosling; Fottrel, 1989) using chemiluminescence but, different from the present trial, those authors developed their own assay bovine antibody derived from rabbits. This result is consistent with those reported by Gimenes et al., 2008), who obtained values ranging from 0.5 to 1.5 ng/mL ($3,00$ to $9,00$ mUI/mL) throughout the estrous cycle, apart from pre-ovulatory surge values. In that trial, RIA was used to obtain the values and the protocols were specific for cattle, as for the present trial, protocols used human kits.

The mean FSH concentration of 3.32 ± 0.17 ng/mL or $19,92 \pm 1,02$ mUI/mL (range: $0.003-12.90$ and mode: 0.402) observed is consistent with those reported by Gimenes et al. (2008), who obtained values between 0.2 ng/mL ($1,2$ mUI/mL) and 11.5 ng/mL (69 mUI/mL)

before follicular divergence and 0.1 to 8.5 ng/mL (0,6 to 51 mUI/mL) after divergence. The higher sensitivity of chemiluminescence can be deduced by the much lower minimum value detected. Bryner et al. (1990) obtained peak values of 2 ng/mL (12 mUI/mL). Martin et al., (2013) in a meta-analysis, reported peaks of 1.3 ng/mL; in the present study, the mean values of 2.1 ng/mL (12,6 mUI/mL) were obtained for the animals with 3 waves and 2.3 ng/mL (13,8 mUI/mL) for the 2-wave animals. In all the studies cited, RIA was used to obtain the data, remembering that the RIA protocols were specific for cattle, differently from this work that used human kits. The analytical sensitivity for RIA in double antibody was 0.005 ng/mL (0,03 mUI/mL) (Gimenes et al., 2007).

Individual LH and FSH Profiles

The progesterone profiles in combination with the LH fluctuations throughout individual sampling days allowed a number of interpretations based on previous publications portraying normal and abnormal cycles normal, mixed and atypical (Bloch et al. 2006; Petersen et al. 2006; Royal et al. 2002;).

Normal profiles

Of the nine set of sampling days whole profiles could be interpreted as normal, since they suggest a single or two estrous cycle patterns (figures 2 to 7). Other profiles contained normal and abnormal patterns, suggesting they were undergoing adjustments in their hypophyseal-gonadal axis.

For animal 3030 (Figure 2), for example, the general mean LH concentration over 30 days was 0.29 ± 0.10 ng/mL ($1,74 \pm 0,60$ mUI/mL) and the limits were between 0.15 and 1.21 ng/mL (0.90 and 7.27 mIU/mL). For values above 0.29 ng/mL ($1,74$ mUI/mL) ($n= 7$), the mean was 0.53 ± 0.24 ng/mL ($3,18 \pm 1,44$ mUI/mL) and 0.22 ± 0.04 ng/mL ($1,32 \pm 0,24$ mUI/mL) for values below 0.29 ng/mL ($1,74$ mUI/mL) ($n= 22$). Considering the probable estrous cycle phase, based on P4 concentrations, that is, between days 1 and 2 of the metestrus, about 8 days before the increase of the progesterone typical of a functional diestrus

CL, an LH peak of 1.21 ng/mL (7.27 mIU/mL) is well characterized (well above two standard deviations of the mean). This peak occurred at the beginning of metestrus and characterizes part of the pulses that should be part of the preovulatory LH surge (Pulley; Keysler; Stevenson, 2015). Additionally, for this same animal, the occurrence of one estrous cycle could be detected according to the parameters described in the literature (Peters, 1985). This particular cycle seemed to be longer than the 21-day normal cycle reported as normal for cattle (Cushman et al., 2007). On the other hand, the LH range was 0.10-6.60 mIU/mL (0.06-1.1 ng/mL)

For animal 3036 (figure 3), which was much higher on its upper limit as compared to the previous animal. Mean LH value for the 30 samples for this animal was 1.38 ± 0.61 mIU/mL (0.23 ± 0.10 ng/mL). In a previous report (Cupp et al. 1995), bovine LH concentration ranged from 0.60 to 1.29 ng/mL (3,6 to 7,74 mUI/mL) within several estrous cycles. Those authors reported a mean LH value of 0.73 ± 0.16 ng/mL ($4,38 \pm 0,96$ mUI/mL) and maximum peak amplitude of 1.32 ± 0.20 ng/mL ($7,96 \pm 1,2$ mUI/mL) which are similar to the ones reported here.

Very few samples in the present experiment were able to coincide with pre-ovulatory surges, because blood was taken once a day compared to 15 minutes sampling interval used in their experiment. Those authors were able to report a pre-ovulatory surge peaking well above 4.5 ng/mL (27,0 ng/mL) throughout a sequence of 15 minutes-sampling protocol. Since our sample was single within a day, the peak value does differ from the baseline value, but cannot be characterized as a surge. Perhaps, it would be more correct to refer to it only as a pulse, because a more frequent sampling within that hour could reveal even higher values (which then should establish the real peak). A follow up on ovulation may clarify whether the current once a day protocol is enough, based on individual profiles, to predict ovulation.

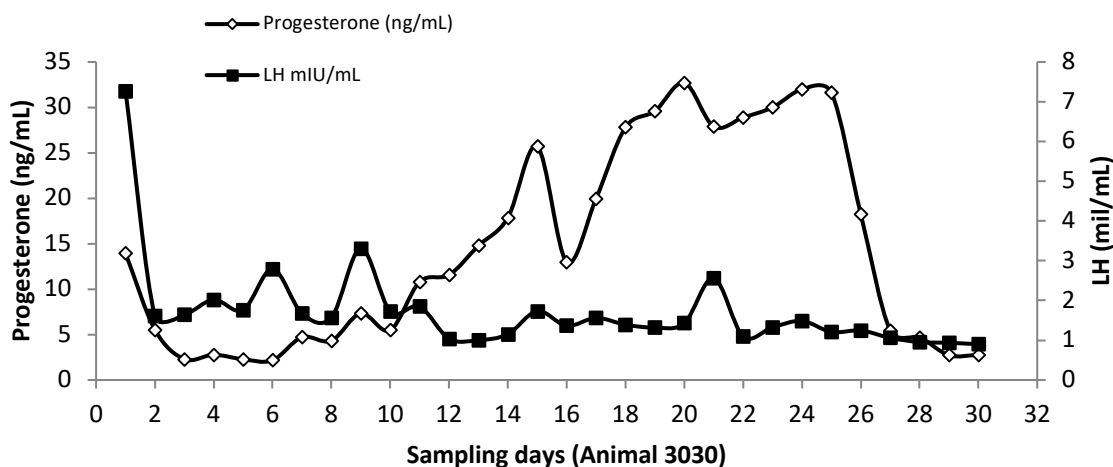


Figure 2 : Hormonal profile of heifer Holandes 3030 obtained by chemiluminescence

Animal 3036 also exemplifies the potential of chemiluminescence to assess a normal LH profile with amplitude similar to that of animal 3030.

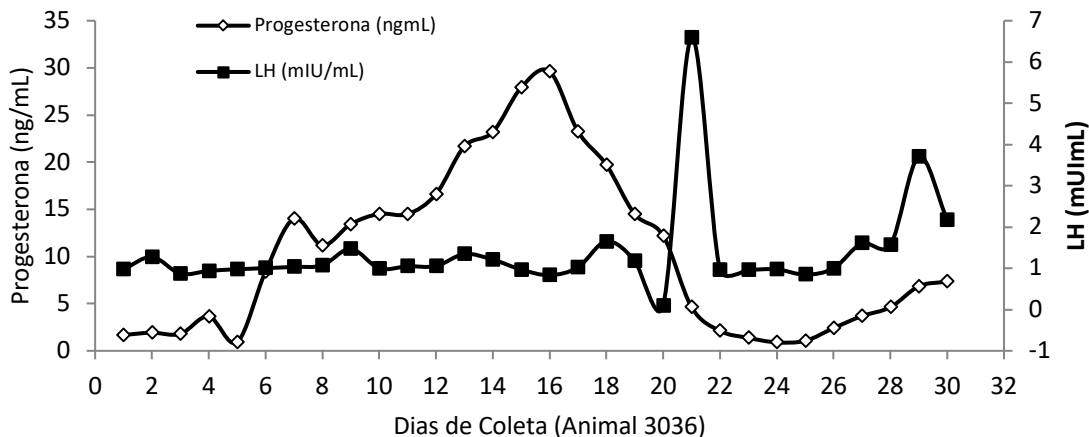


Figure 3: Hormonal profile of heifer Holandes 3036 obtained by chemiluminescence.

As for the profile of animal 3037 (figure 4) it may be interpreted as normal initially, but it must be noted that the amplitude of the LH pulse is lower than the previous profiles describe in this section. This lower pulse amplitude may indicate that this is only a component of the several ones that will comprise the surge, or may simply be a reflex of individual

variations, as reported previously (Martin et al. 2013). Note that the estrous cycle length based on P4 is within normal ranges (Peter, 1985).

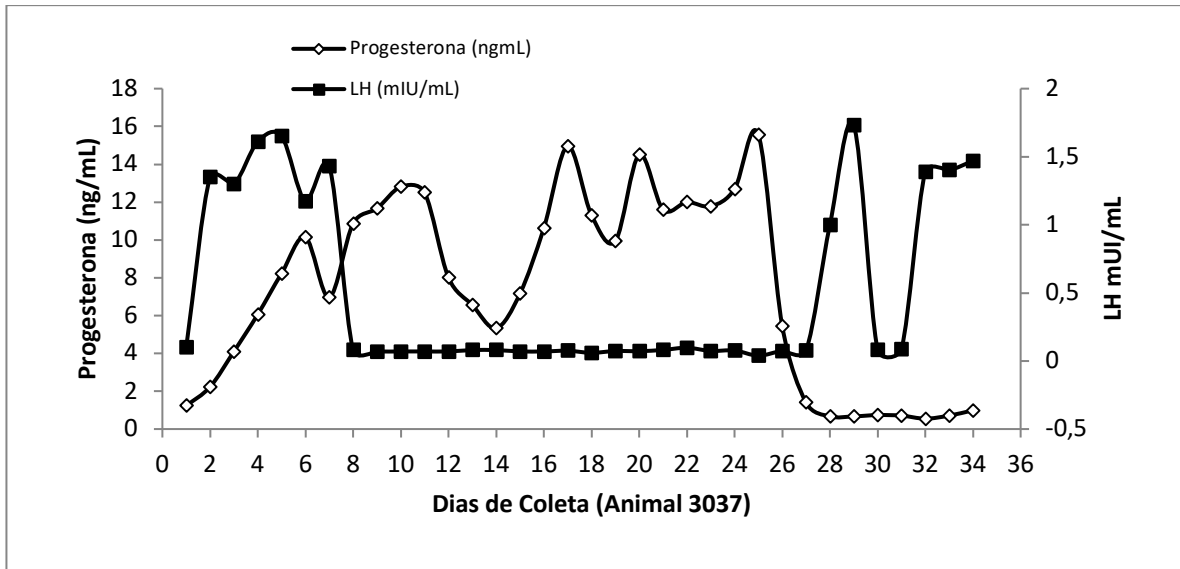


Figure 4: Hormonal profile of heifer Holandes 3037 obtained by chemiluminescence.

Mixed LH Profiles

The variations in LH profiles observed may reflect adjustments the gonadal-central nervous system is undergoing. In the bovine species most reports do not deal with abnormal gonadotropin patterns in the peripheral blood (REIMERS et al., 1996). In the profile of animal 3019 (figure 5) from days 0 to 8 of the estrous cycle, a normal metestrus profile can be observed, which includes a drop in P4 (luteolysis) and a pulse of LH (part of a set of pulses which should compose a surge) right before a rise in P4 typical of a transition of metestrus to early diestrus (Peters, A.R., 1985). From day 8 to 16 an irregular pattern develops, since P4 did not continue to rise as expected. From day 20 until day 40, the pattern is similar to that of a normal cycle according to a meta-analysis previously reported (Martin et al. 2013). This profile includes three types of pulses within distinct estrous cycle phases, where baseline, pre-ovulatory (end of estrus and/or early metestrus), and diestrus are located between days 0 and 2 (in various subsequent moments), days 19-21 and 30-32, respectively.

Similarly, the occurrence of atypical peaks, unexplained by P4 or E2 variations have been reported in bovine RIA studies (Cupp et al., 1985; Bloch et al. 2006).

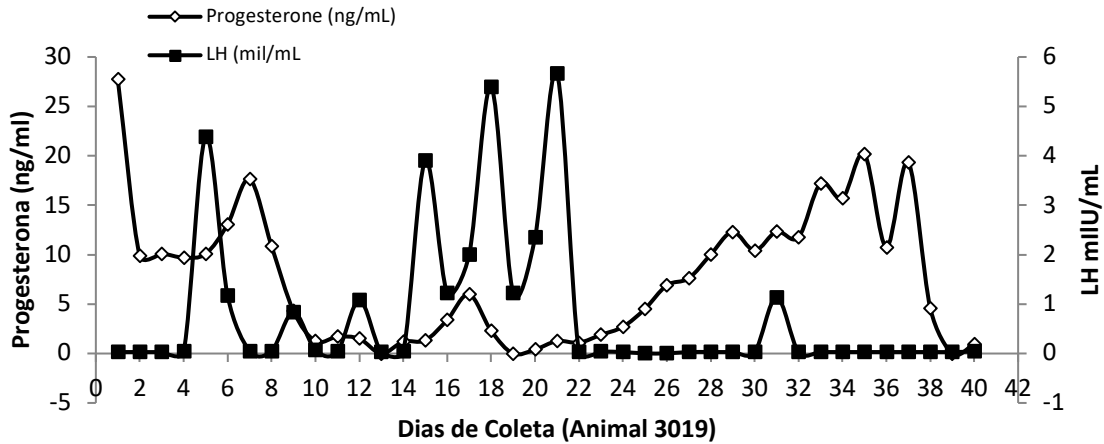


Figure 5: Hormonal profile of heifer Holandes 3019 obtained by chemiluminescence.

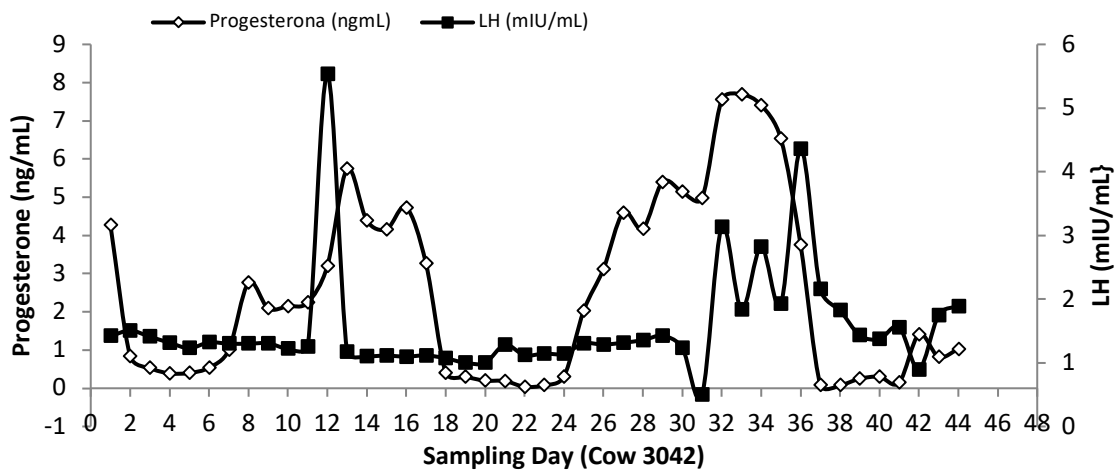


Figure 6: Hormonal profile of heifer Holandes 3029 obtained by chemiluminescence.

Atypical LH Profiles

Another example of atypical LH pulse was observed between sampling days 8 and 11 in animal 3029 (Figure 6). The amplitude of the pulse resembles that seen in presumptive pre-ovulatory situations in this trial and elsewhere with RIA in bovine (Peters et al. 1985),

but the time point is not normal, for it is occurring concomitantly with elevated P4. Additionally, the length of the elevated progesterone is abnormally short and may indicate a dysfunctional CL (Bisinoto et al. 2010). The same pattern seems to be initiating on sampling day 18 onwards and may indicate recurrence. This type of profile may also indicate that the present protocol can be useful to define individual reproductive status especially if it is associated with abnormal estrous cycle parameters diagnosed by ultrasonography and behavioral observations.

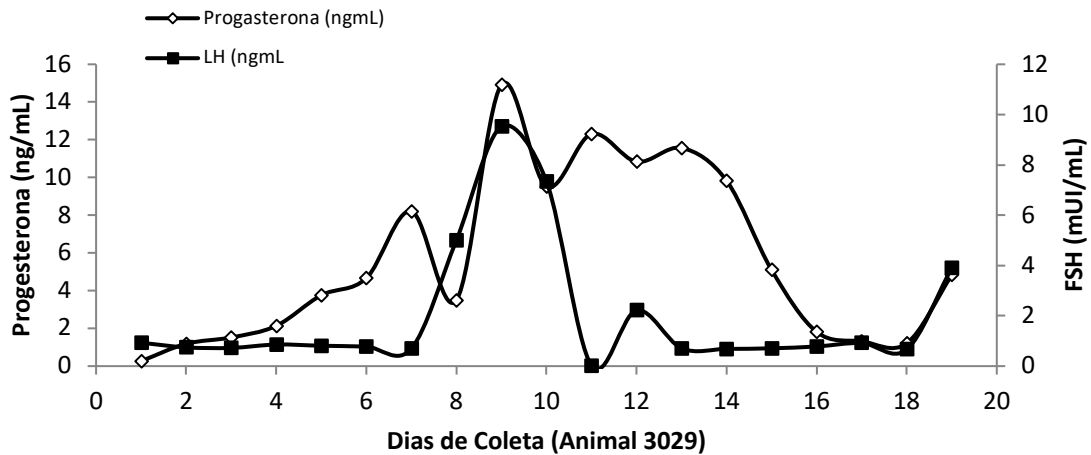


Figure 7: Hormonal profile of heifer Holandes 3039 obtained by chemiluminescence.

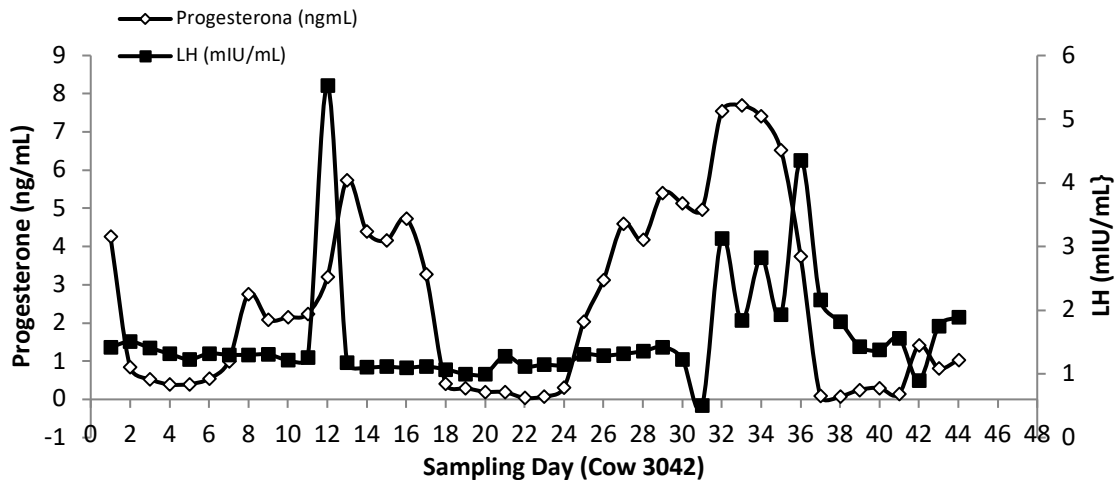


Figure 8: Hormonal profile of heifer Holandes 3042 obtained by chemiluminescence.

Profile from animal 3039 (Figure 7) suggests a normal estrous cycle length concerning the progesterone concentrations and typical, for the time point, pre-ovulatory rise in LH between days 22 and 26 according to previous reports with RIA in bovines (Cushman et al. 2007). However, as the time progresses, there is no rise in progesterone as expected. Instead, a period of high LH peaks ensues during the period that should have been the diestrus if P4 had risen. This may indicate a non-ovulatory follicle which allowed the rise in LH concentrations, probably from removing the P4-driven negative feedback at the hypothalamic-hypophyseal level. Once more, the current protocol may explain field situations, as long as, additional ultrasound and behavioral data provide support for this interpretation. This compensatory behavior by the central nervous system in the face of steroid absence is well documented in bovine (Ireland; Roche, 1982 and Mohan, 1998).

LH Pulse Type Characteristics

The occurrence of LH pulses at distinct estrous cycle intervals has been proposed as a means to establish individual profiles that may be helpful in the assessment of the reproductive status of a heifer. Mean values for baseline, atypical, diestrus and pre-ovulatory pulses are depicted on table 3.

Table 1. Pulse type and peripheral plasma LH concentrations (ng/mL)¹ in lactating cows by chemiluminescence². Numbers are least square means \pm standard error mean.

Pulse Type ³	Sample Number	Mean LH (ng/mL)	Pairwise Comparisons*	Probability
Baseline	201	5.49 \pm 0.61	Baseline VS. Atypical	0.0002
Atypical	54	19.95 \pm 1.18	Baseline VS. Diestrus	0.0043
Diestrus	25	12.25 \pm 1.73	Baseline VS. Pre-ovulatory	0.0001
Pre-ovulatory	43	19.13 \pm 1.32	Atypical VS. Diestrus	0.3226
			Atypical VS. Pre-ovulatory	0.0086
			Diestrus VS. Pre-ovulatory	0.0001

Student's under the mixed model

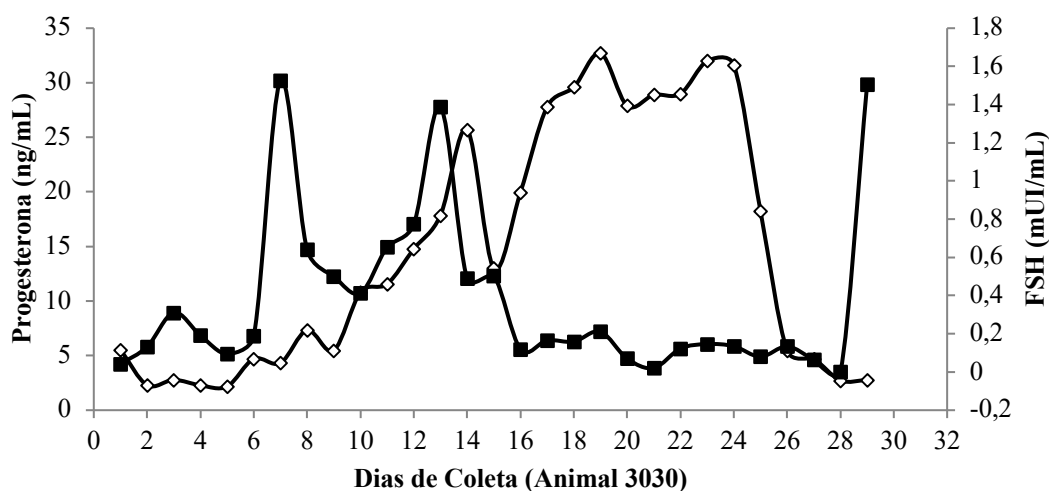
¹Data have been converted to ng/mL from its original value expressed in mIU/mL by dividing it by 6. Assays were performed with Access 2® (Beckman Coulter, Belo Horizonte, Brazil) using a human kit.

³Pulse type was based on the progesterone profiles throughout a consecutive-day series of serum samples obtained from heifers Holstein/zebu (n=9).

FSH Profiles

As with the LH pulses, FSH pulses were situated along the sampling period and was used to corroborate the LH surge, as well as, increases that usually take place before follicular waves during diestrus (Lonergan et al. 2011).

The profile of animal 3030 (figure 10) depicts diestrus pulses and a typical pulse on day 28 with proportionately high amplitude suggesting a pre-ovulatory rise, as a surge component. This result can only be interpreted as a suggestion of normality since the collection interval is of 24 hours. Pulses at days 7 and 13, could indicate pre-wave rises (Ginther et al. 1998). The same interpretation is valid for animal 3036 (figure 10) with respect to pre-wave FSH rises on days 9 and 28 (subsequent cycle) and as a presumptive component of a surge for samples on days 19 and 21. The remaining individual FSH profiles are a reflex of normal variations throughout the estrous cycle, which are well documented in the literature (Ginther et al. 1998; Hayashi et al. 2008), and corroborate the usefulness of the proposed protocol.



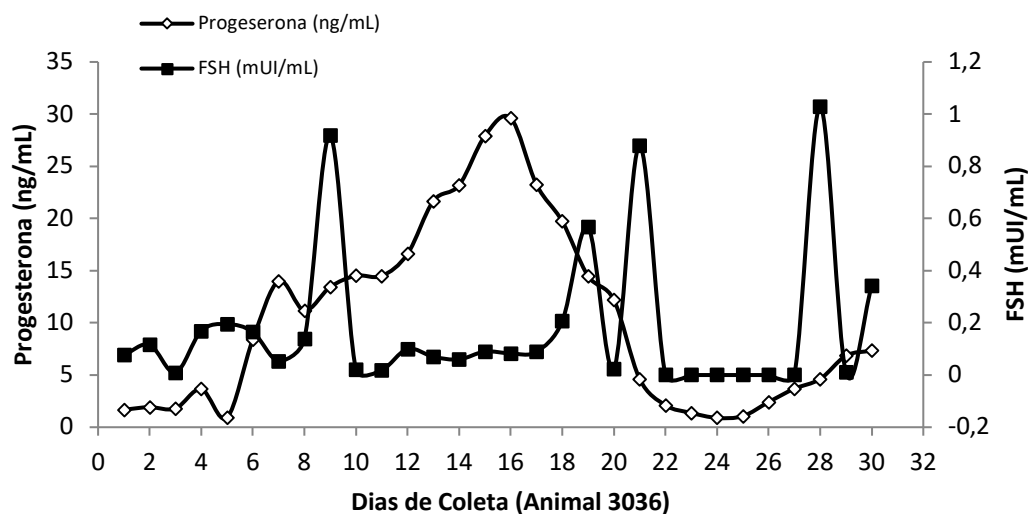


Figure 9: Hormonal profile of heifers Holandes 3030 and 3036, obtained by chemiluminescence.

Imprecision Tests

When the imprecision for LH study was performed, the following mean values were obtained: 0,34 mIU / mL (0,006 ng/mL), standard deviation (SD) of 0.023 and CV% of 6.84% of the same control with concentrations for Intra assay, mean of 0.61 (0,10 ng/mL), SD of 0.01 and CV% of 2.14%, of the same control for assay1, mean of 0.54 mIU / mL (0,09 ng/mL), DP of 0.04 and CV% of 6.67% for inter assay 2 and, lastly, the same control for the inter assay , a mean of 0.73 mIU / mL (0,12 ng/mL), a DP of 0.04 and a% CV of 4.87% were obtained (Table 2). These results are comparable to those obtained for bovines by Abdul-Ahad et al (1988) in which the detection limit was 15 pg/tube and sensitivity, determined as the smallest amount measurable with a between-sample coefficient of $\leq 10\%$, was 28 pg/tube.

Table 2: Mean, coefficient of variation CV (%) and standard deviation for LH em mUI/mL

Replicate	Intra Assay	Inter Assay 1	Inter Assay 2	Inter Assay 3
01	0.32	0.61	0.56	0.72
02	0.35	0.62	0.50	0.78
03	0.31	0.63	0.50	0.69
04	0.37	0.60	0.54	0.76
05	0.35	0.60	0.58	0.72
06	0.30			
07	0.36			
08	0.33			
09	0.33			
10	0.37			
11	0.35			
12	0.32			
13	0.34			
14	0.37			
15	0.37			
SD	0.023	0.01	0.04	0.036
Mean	0.343	0.61	0.54	0.73
%CV	6.84	2.13	6.67	4.87

For the quantification of LH, the test was performed as reported by Bolt et al. (1990), With a mean intra-assay CV of 9.36% for the high control 7.26 ng/mL (43,56 mUI/mL) and 13.31% for the low control 0.34 ng/mL (2,04 mUI/mL); the inter-assay CV was 12.37% for the high control and 13.74% for the low control, with a sensitivity of 0.048 ng/mL. In the calculation of imprecision, the following mean LH values were observed: mean the 16.23 mIU / mL (2,71 ng/mL), standard deviation (SD) of 0.62 and a% CV of 3.8%.

In table 2 the mean value, coefficient of variation and standard deviation of mUI / mL concentrations of luteinizing hormone (LH) of Holstein females during the estrous cycle are within the acceptable standards of the World Health Organization in 2014.

When the imprecision for FSH study was performed, the following mean values were obtained: 16,23 mIU / mL (2,71 ng/mL), standard deviation (SD) of 0.62 and CV of 3,8% of

the same control with concentrations for Intra assay, mean of 0.71 (0,10 ng/mL), SD of 0.01 and CV of 6,10%, of the same control for assay1, mean of 0.67 mIU / mL (0,0,11 ng/mL), DP of 0.04 and CV of 9,40% for inter assay 2 and, lastly, the same control for the inter assay, a mean of 0.70 mIU / mL (0,12 ng/mL), a DP of 0.04 and a CV of 412,30% were obtained (Table 3)

Table 3: Mean, coefficient of variation CV (%) and standard deviation for FSH in mUI/mL

Replicate	Intra assay	Inter assay 01	Inter assay 02	Inter assay 03
1	17.02	0.65	0.65	0.58
2	16.58	0.73	0.72	0.65
3	16.10	0.712	0.75	0.76
4	16.02	0.69	0.59	0.72
5	16.25	0.76	0.65	0.79
6	15.52			
7	15.37			
8	15.62			
9	17.02			
10	15.79			
11	16.13			
12	17.40			
13	16.46			
14	15.49			
15	16.64			
Mean	16.23	0.71	0.67	0.70
SD	0.62	0.04	0.06	0.09
CV	3.8%	6.1%	9.4%	12.3%

The linearity and analytical sensitivity data for FSH and LH can be seen in the table 3 in Annex 3 and 4 of the calibration curve, with analytical sensitivity values of 0.0455 mUI/mL (0,008 ng/mL) and linearity of 195.2812 mIU / mL (32,55 ng/mL) for FSH and 0.042 mUI/mL (0,008ng/mL)) and linearity 250.8239 mIU /mL (41,80 ng/mL).

The results obtained can be compared to RIE results, which have been routinely used in research studies of the last decades.

Based on these data, this work demonstrates that FSH dosages, by chemiluminescence, can be an excellent tool in the monitoring and diagnosis of the reproductive status of Holandes cattle.

According to some commercial laboratories performing the hormonal dosages for domestic animal hormones, there is no definition of reference values by chemiluminescence. As with progesterone dosages, FSH dosages and LH should undergo a formal validation process, compared to RIA. The difficulty of carrying out this validation is due to the cost of the RIA, especially with respect to the requirements to handle radioactive material. Perhaps the most appropriate way is to obtain reagents prepared specifically for cattle and the consolidation of chemiluminescence by their more frequent use and consequent publications.

CONCLUSIONS

It can be concluded that the chemiluminescence methodology has the potential to be used in the monitoring of estrous cycle phases, as a diagnostic aid and as a tool in the evaluation of ovarian and pituitary function in cattle. The method can target interventions and solutions that improve the outcome of assisted reproductive technologies such as IATF protocols and hormonal stimuli for the production of oocytes and embryos. It can also be an adjunct to routine reproductive management by detecting hormone production problems and can be used in the diagnosis and monitoring of pregnancy. Further studies should be carried out to ensure that this methodology is adequate and validated for use in cattle

REFERENCES

ABDUL-AHAD, W.G.; GOSLING, J.P.; FOTTRELL, P.F. Chemiluminescent immunoassay for bovine luteinizing hormone. **Biochemical Society Transactions**, London, v.17, n.2, p.412-413, 1989.

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

BISINOTO, R.S.; SANTOS, J.E.P. The use of endocrine treatments to improve pregnancy rates in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, 24, 258–266, 2012.

BLOCH, A.; FOLMAN, Y.; KAIM, M.; ROTH, Z.; BRAUN-TAL, R.; WOLFENSON, D. Endocrine alterations associated with extended time interval between estrus and ovulation in high-yield dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, v.89:4694–4702, 2006.

BOLT, D.J.; SCOTT, V.; KIRACOFE, G.H. Plasma LH e FSH after Estradiol, norgestomet and GnRH treatment in ovariectomized beef heifers. **Animal Reproduction Science**, v.23, n. 4, p. 263-271, 1990.

BRYNER, R.W.; GARCIA-WINDER, M.; LEWIS, P.E.; INSKEEP, E.K.; BUTCHER, R.L. Changes in hormonal profiles during the estrous cycle in old lactating beef heifers. **Domestic Animal Endocrinology**, v.7, n.2 p. 181-190, 1990

COLAZO, M.G.; MAPPLETOFT, R.J. A review of current timed-AI (TAI) programs for beef and dairy cattle. **Canadian Veterinary Journal**, V.55, n.8: 772–780. 2014.

CUPP, A.S.; STUMPF, T.T.; KOJIMA, F.N.; WEERTH, L.A.; WOLFE, M.W.; ROBERSON, M.S.; KITOK, R.J.; KINDER, J.E. Secretion of gonadotrophins change during the luteal phase of the bovine oestrus cycle in the absence of corresponding changes in progesterone or 17 Beta estradiol. **Animal Reproduction Science**, v. 37, n.2, p. 109-119, 1995.

CUSHMAN, R.A.; ALLAN, M.F.; THALLMAN, R.M.; CUNDIFF, L.V. Characterization of biological types of cattle (Cycle VII): Influence of postpartum interval and estrous cycle length on fertility. **Journal of Animal Science**. v. 85, n.9, 2156–2162, 2007.

Demers, L.M.; Noel, SA ; Goldsmith, BM ; Christenson, RH. Performance of an automated enhanced **chemiluminescence** immunoassay for **FSH**, **LH**, Estradiol, Progesterone and Prolactin on the Ortho Clinical Diagnostics Vitros Eci system. **Clinical Chemistry**, 1998 Jun, Vol.44 Suppl 6, pp. A61-A61

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

GIMENES, L.U.; SÁ FILHO, M.F.; TORRES-JUNIOR, J.R.; BELTRAN, M.P.; NOGUEIRA, G.P.; BARUSELLI, P.S. Perfil de FSH e LH na divergência folicular em novilhas nelore (*Bos indicus*). **Brazilian Journal of Veterinary Research in Animal Science**, v.45 n.1, p. 11-16, 2008.

GINTER, O.J.; BERGFELT, D.R.; KULICK, L.J.; KOT, K. Pulsatility of systemic FSH e LH concentrations during follicular-wave development in cattle. **Theriogenology**, v.50, p.507-519, 1998.

HAYASHY, K.G.; MATSUI.M.; SHIMIZU, T.; SUDO, N.; SATO, A.; SHIRASUNA, K.; TETSUDA, M.; KIDA, K.; SCHAMS, D.; MYAMOTO, A. The absence of corpus luteum formation alters the endocrine profile and affects follicular development during the first follicular wave in cattle. **Reproduction**. v.136 787–797, 2008

HERBISON, A.E. Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing hormone neurons. **Nature Reviews Endocrinology**, v.12 n.3, p. 452–466, 2016.

IRELAND, J.J.; MIHM, M.; AUSTIN, E.; DISKIN, M.G.; ROCHE, J.F. Historical perspective of turnover of dominant follicles during the bovine estrous cycle: key concepts, studies, advancements, and terms. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.1648-1658, 2000.

LONERGAN, P. Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in heifers. **Theriogenology**. v.76. 1594–1601, 2011.

LOPES, P.R.; FURTADO, P.V.; SOUZA, R.H.F.A.; OLIVEIRA, C.A. Importância e metodologias para mensuração dos esteroides sexuais em ruminantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.39, n.3, p.322-328, 2015.

MARTIN, O.; FRIGGENS, N.C.; DUPONT, J.; SALVETTI, P.; FRERET, S.; RAME, C.; ELLIS, S.; GATIEN, J.; DISENHAUS, C.; BLANC, F. Data-derived profiles with corepresentation of progesterone, estradiol, LH, and FSH dynamics during the bovine estrous cycle. **Theriogenology**, v.79, p. 331-343, 2013.

MOHAN, M. Effects of unilateral ovariectomy on follicular development, plasma gonadotropin, progesterone, IGF-I profiles, ovulation and pregnancy rates in cattle. **Thesis**. Tamil Dana and Veterinary Sciences University, Madras, India. 119 p. 1998.

MOURA, R. A. **Técnicas de laboratório**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2001.

PATTON, P.E.; LIM, J.Y.; HICKOK, L.R.; KETTEL, L.M.; LARSON, J.M.; PAU, K.Y. Precision of progesterone measurements with the use of automated immunoassays analyzers and the impact on clinical decisions for in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**, v.101, n.5, p. 1629-36, 2014.

PAWSON, A.J.; McNEILLY, A.S. The pituitary effects of GnRH. **Animal Reproduction Science**, v.88(1-2): 75–94, 2005.

OOHASHI, E.; YAGI, K.; UZUKA, Y.; TANABE, S.; SARASHINA, T.; ISHIDA, T. Seasonal changes in serum total thyroxine, free thyroxine and canine thyroid-stimulating hormone in clinically healthy beagles in Hokkaido. **Journal of Veterinary Medicine and Science**, v. 63, n.11, p.1241-1243, 2001.

PETERS, A.R. Studies of hormone patterns during the oestrous cycle of beef heifers. **Reproduction Nutrition Développement**, v. 25, 5, 919-927, 1985.

PETERSEN, K.J.; GUSTAFSSON, H.; STRANDBERG, E.; BERGLUND, B. Atypical progesterone profiles and fertility in Swedish dairy heifers. **Journal of Dairy Science**. 89(7):2529–2538. 2006.

PULLEY, S.L.; KEISLER, D.H.; STEVENSON, J.S. Concentrations of luteinizing hormone and ovulatory response in dairy heifers before timed artificial insemination. **Journal of Dairy Science**. v. 98 n.1, p.1–14, 2015.

REIMERS, T.J.; SALERMO, V.J.; LAMB, S.V. Validation and Application of Solid-phase Chemiluminescent Immunoassays for Diagnosis of Endocrine Diseases in Animals. **Comparative Haematology International**. v.6:170-175, 1996.

ROYAL, M.D.; FLINT, A.P.F.; WILLIAMS, J.A. Genetic and phenotypic relationships among endocrine and traditional fertility traits and production traits in Holstein-Friesian dairy heifers. **Journal of Dairy Science**. v.85:958–967, 2002.

SINGH, 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, n.3:261-8. 1997.

SUNDERLAND, S.J.; CROWE, M.A.; BOLAND, M.P; ROCHE, J.F.; IRELAND, J.J. Selection, dominance and atresia of follicles during the estrous cycle of heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 101, n.3, p. 547-555, 1994.

SAS. **A Handbook of Statistical Analyses using SAS**. 2 ed. Boca Raton; London; New York; Washington, D.C., 2002. 351p.

STEINBECK, M. J.; WYNER, L. R. Immunoassay and Related Principles. In: ANDERSON, S. C.; COCKAYNE, S. **Clinical Chemistry: concepts and applications**. Philadelphia: HBJ International Edition; W. B. Saunders, 1993. p.96-99.

VAZQUEZ, B. I.; FÉAS, X.; LOLO, M.; FENTE, C.A.; FRANCO, C.M.; CEPEDA, A. Detection of synthetic corticosteroids in bovine urine by chemiluminescence high-performance liquid chromatography. **Luminescence**, v. 20 n.3, p. 197-204, 2005.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Standards tables. 2014.

YALOW, R. S.; BERSON, S. A. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. **Nature**, 184(Suppl 21) p. 1648-1649, 1959.

Anexos

Tabela 01 – valores de referência para o P4 diversas espécies por quimioluminescência em dois laboratórios brasileiros

<i>Espécie</i>	<i>Fase do ciclo</i>	<i>Valores (ng/mL) Lab 01</i>	<i>Valores (pg/mL) Lab 02</i>
Canina	Anestro ou Proestro	Menor que 1,00	
	Estro ou final Diestro ou Gestação	De 1,00 a 30,00	330,00 a 600,00
	Fase ovulatória	De 4,00 a 8,00	Menor que 100,00
	Diestro / gestação	Maior que 10,00	1570,00 a 6930,00
	Macho	Menor que 0,20	Menor que 200,00
Bovino	Sem atividade Luteal	Menor que 1,00	Até 900,00
	Em atividade Luteal	De 4,00 a 10,00	
	Início Gestação	10,00 a 20,00	1570,00 a 6930,00
	Final da Gestação	5,00	
	Macho	Menor que 0,20	
Equino	Estro / Anestro	Menor que 1,00	
	Diestro	Maior que 5,00	
	Macho	Menor que 0,20	
Felino	Estro / Anestro	Menor que 1,00	
	Gestação / Falsa Gest	Maior que 5,00	
	Macho	Menor que 0,20	

Tabela 02: curva de calibração de progesterona (P4) Lote Reagente Beckman Coulter 536695

<i>Conc. Esperada</i>	<i>RLU (média)</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>% CV</i>	<i>Valor obtido (ng/mL)</i>
0,00	1043425,00	12184,64	1,17	0,02
1,00	698359,33	12335,65	1,77	1,01
4,30	397009,00	830,14	0,21	4,07
9,90	237246,50	3834,64	1,62	10,03
20,60	152226,50	1382,39	0,91	20,57
40,00	102641,25	7890,96	7,69	40,23

Tabela 03; Curva de calibração de FSH – Lote Reagente Beckman Coulter 527635

<i>Conc. Esperada</i>	<i>RLU (média)</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>% CV</i>	<i>Valor obtido (mUI/mL)</i>
0,00	10304,40	711,64	6,91	0,0455
1,00	21353,16	254,06	1,19	1,0075
9,90	120395,50	796,91	0,66	10,0875
49,90	528536,50	24303,97	4,60	48,9293
100,00	1057010,00	28,28	0,00	100,9532
200,00	1956710,00	58081,75	2,97	195,2812

Tabela 04: Curva de calibração de LH – Lote de Reagente Beckman Coulter 529669

<i>Conc. Esperada</i>	<i>RLU (média)</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>% CV</i>	<i>Valor obtido (mUI/mL)</i>
0,00	9241,42	70,18	0,76	0,0042
1,90	27281,45	800,09	2,93	1,9098
9,60	98169,25	2456,14	2,50	9,4200
24,80	232935,00	4904,49	2,11	23,7020
99,00	933703,00	18792,07	2,01	100,5345
254,00	2064525,00	27697,37	1,34	250,8239

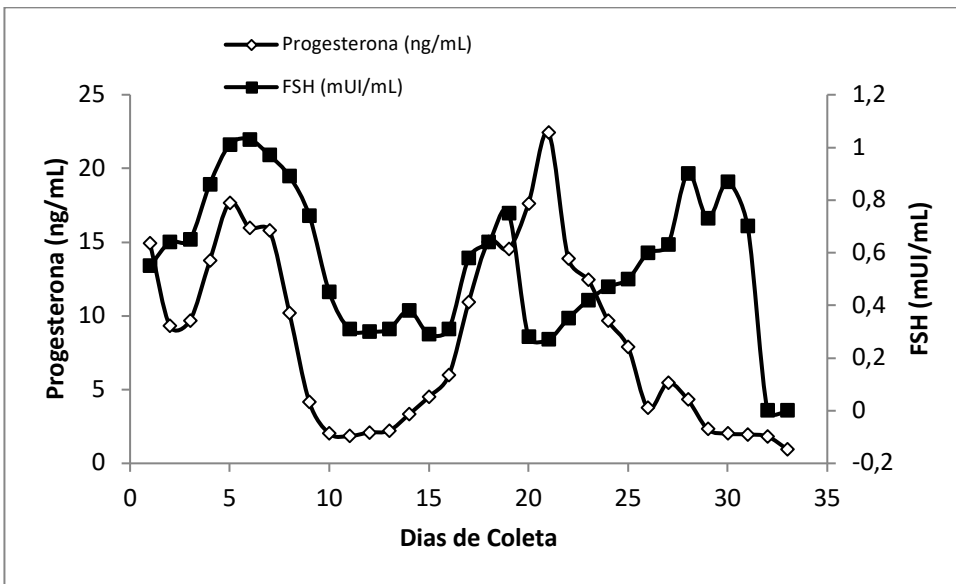


Figura 01: concentrations FSH x P4 in the animal 3043

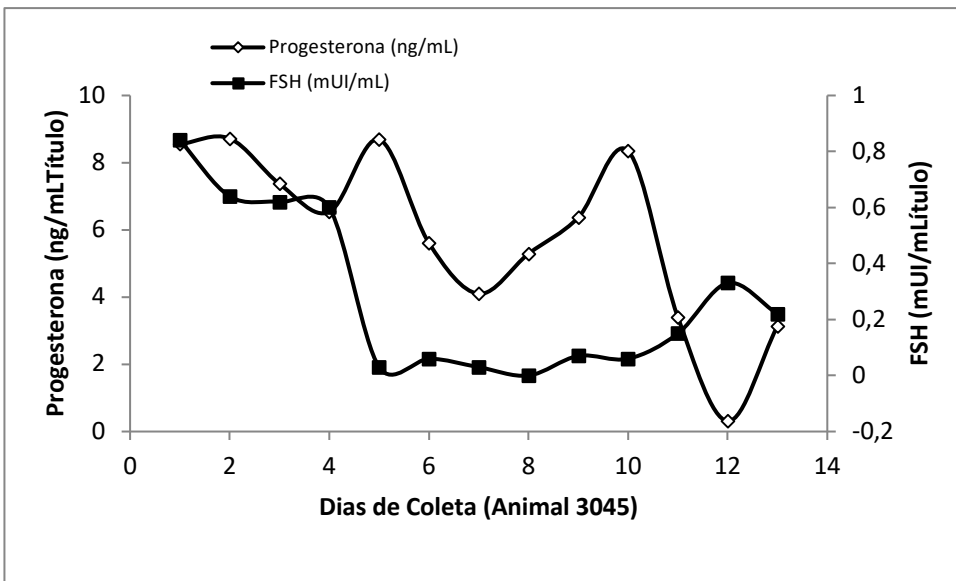


Figura 02: concentrations FSH x P4 in the animal 3045

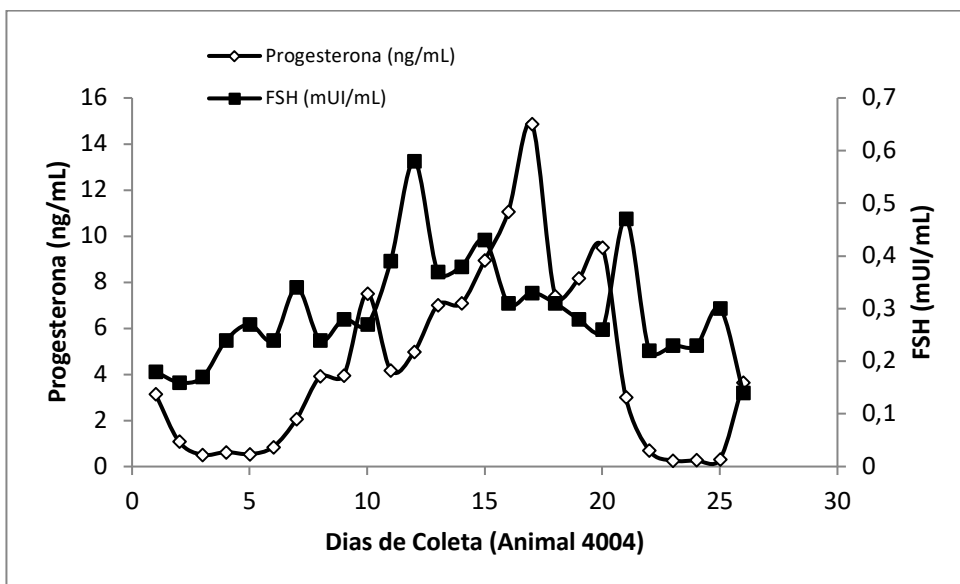


Figura 03: concentrations FSH x P4 in the animal 4004

Tabela 05: Medidas CL (mm) x P4(ng/mL) x FSH (mUI/mL) X LH (mUI/mL) animal 3019

Ordem	Data	Corpo Luteo	P4	FSH	LH
1	26/03/2015	28,15	27,72	2,07	8,44
2	27/03/2015	14,58	9,88	0,07	0,03
3	28/03/2015	18,94	10,10	0	0,03
4	29/03/2015	19,84	9,70	0,01	0,03
5	30/03/2015	20,14	10,08	0,06	4,39
6	31/03/2015	20,80	13,07	0,70	1,17
7	01/04/2015	21,55	17,63	0	0,03
8	02/04/2015	20,97	10,88	0	0,03
9	03/04/2015	16,15	4,30	2,64	0,84
10	04/04/2015	18,39	1,25	5,04	0,03
11	05/04/2015	14,20	1,71	0,15	0,04
12	20/04/2015	12,50	6,90	2,81	0,03
13	21/04/2015	13,45	7,61	0,02	0,03
14	22/04/2015	15,20	10,01	0	0,03
15	23/04/2015	14,39	12,30	11,21	0,03
16	24/04/2015	17,80	10,42	3,19	12,90
17	25/04/2015	15,95	12,34	1,96	1,14
18	26/04/2015	19,55	11,76	0	0,03
19	27/04/2015	13,45	17,20	3,25	0,03
20	28/04/2015	14,10	15,71	0,09	0,03
21	29/04/2015	18,49	20,16	0,07	0,03
22	30/04/2015	17,10	10,74	0	0,03
23	01/05/2015	14,40	19,33	0,01	0,03

Tabela 06: Corpo Luteo (mm) x P4 (ng/mL) x FSH (mUI/mL) x LH (mUI/mL) Animal 3029

Ordem	Data	Corpo Luteo	P4	FSH	LH
7	18/04/2015	17,55	8,21	0,03	0,70
8	19/04/2015	15,40	3,50	0,03	10,00
9	20/04/2015	18,50	14,91	9,53	1,72
10	21/04/2015	22,70	9,52	7,35	90,01
11	22/04/2015	21,65	12,31	21,00	0,024
12	23/04/2015	21,40	10,83	0	1,17
13	24/04/2015	22,15	11,57	0	0,71
14	25/04/2015	20,97	9,83	0	0,69
15	26/04/2015	13,15	5,10	0	0,71
16	27/04/2015	17,80	1,82	0,22	0,78
17	28/04/2015	15,30	1,31	0	0,91

Tabela 07: Dados de CL (mm) x P4 (ng/mL) x FSH (mUI/mL) x LH (mUI/mL) animal 3036

Ordem	Data	P4	FSH	LH	
4	30/03/2015	15,30	3,65	0,70	0,17
5	31/03/2015	17,05	3,92	0,74	0,20
6	01/04/2015	20,46	8,42	0,75	0,17
7	02/04/2015	23,75	14,00	0,78	0,06
8	03/04/2015	23,84	11,18	0,80	0,14
9	04/04/2015	26,74	13,44	1,10	0,92
10	05/04/2015	25,79	14,51	30,63	2,23
11	06/04/2015	24,86	14,50	0,79	0,02
12	07/04/2015	24,15	16,61	0,79	0,15
13	08/04/2015	23,32	21,68	0,99	0,07
14	09/04/2015	23,30	22,76	0,89	0,05
15	10/04/2015	25,39	25,47	0,79	0,08
16	11/04/2015	21,35	29,61	0,63	0,08
17	12/04/2015	22,60	23,25	0,79	0,08
18	13/04/2015	22,92	19,72	1,24	0,21
19	14/04/2015	22,66	14,49	0,89	0,27
20	15/04/2015	22,19	12,21	0,83	0,02
21	16/04/2015	20,09	4,63	4,95	0,88
22	17/04/2015	17,75	2,11	0,73	0
23	18/04/2015	12,95	1,37	0,73	0
24	19/04/2015	13,75	0,88	0,73	0
25	20/04/2015	17,25	1,06	0,64	0
26	21/04/2015	16,45	2,41	8,97	0
27	22/04/2015	19,15	3,69	1,21	0
28	23/04/2015	17,75	4,56	2,45	0,05
29	24/04/2015	21,80	6,84	15,86	56,33
30	25/04/2015	23,00	7,54	0,03	3,54

Tabela 08: Dados de CL (mm) x P4 (ng/mL) x FSH (mUI/mL) x LH (mUI/mL) animal 3030

Ordem	Data	Corpo Luteo	P4	FSH	LH
4	11/04/2015	12,94	0,28	0,79	2,47
5	12/04/2015	15,54	1,05	0,92	2,50
6	13/04/2015	12,20	1,65	0,76	2,50
7	14/04/2015	16,89	0	1,11	1,80
8	15/04/2015	18,15	3,02	10,94	0,75
9	16/04/2015	20,63	3,80	1,69	0,72
10	17/04/2015	20,34	1,18	1,78	0,89
11	18/04/2015	20,50	5,00	2,52	0,73
12	19/04/2015	16,95	3,04	2,25	0,78
13	20/04/2015	20,00	5,81	2,60	0,74
14	21/04/2015	22,40	7,75	1,97	0,69
15	22/04/2015	19,95	4,7	2,76	0,75
16	23/04/2015	12,70	4,90	2,05	0,83
17	24/04/2015	18,60	0,91	2,502	0,56
18	25/04/2015	20,15	4,89	2,38	0,78
19	26/04/2015	16,55	3,4	28,18	3,65
20	27/04/2015	17,35	2,13	2,18	0,86
21	28/04/2015	16,75	0,46	6,88	0,61
22	29/04/2015	19,64	0,25	3,43	0,86
23	30/04/2015	17,90	0,30	7,33	0,94
24	01/05/2015	17,15	1,77	6,57	1,51
25	02/05/2015	16,53	0,20	2,44	1,09
26	03/05/2015	16,38	1,38	7,39	0,92
27	04/05/2015	16,02	0,31	9,24	0,92
29	06/05/2015	14,71	0,47	5,78	0,98
31	08/05/2015	14,25	0,37	4,86	0,74
32	09/05/2015	15,90	0,28	8,04	0,97
33	10/05/2015	19,77	0,38	5,13	0,94

Tabela 09: Animal 3037 CL (mm) x P4 (ng/mL) X FSH (mUI/mL) x LH (mUI/mL)

Ordem	Data	Corpo Luteo	P4	FSH	LH
4	29/03/2015	12,94	6,06	2,60	1,61
5	30/03/2015	15,54	8,23	1,98	1,65
6	31/03/2015	12,20	10,14	1,57	1,17
7	01/04/2015	16,89	6,96	1,49	1,43
8	02/04/2015	18,15	10,87	1,00	0,08
9	03/04/2015	20,63	11,66	0,45	0,07
10	04/04/2015	20,34	12,81	0,91	0,07
11	05/04/2015	20,50	6,70	0,98	0,07
12	06/04/2015	16,95	2,5	1,01	0,07
13	07/04/2015	20,00	8,01	1,98	0,07
14	08/04/2015	22,40	6,56	1,79	44,09
15	09/04/2015	19,95	5,33	9,71	0,08
16	10/04/2015	12,70	7,16	0,67	10,03
17	11/04/2015	18,60	10,62	1,10	0,07
18	12/04/2015	20,15	14,96	1,16	0,08
19	13/04/2015	16,55	11,31	1,21	0,06
20	14/04/2015	17,35	9,94	1,55	0,07
21	15/04/2015	16,75	14,51	0,85	0,07
22	16/04/2015	19,64	11,61	0,99	0,08
23	17/04/2015	17,90	12,01	1,36	0,10
24	18/04/2015	17,15	11,78	1,17	0,07
25	19/04/2015	16,53	12,69	3,93	0,77
26	20/04/2015	16,38	15,56	1,12	0,07
27	21/04/2015	16,02	5,45	1,50	0,07
29	23/04/2015	14,71	0,67	1,6	106,82
31	25/04/2015	15,90	0,74	5,95	0,08
32	26/04/2015	15,90	0,71	1,13	0,09
33	27/04/2015	10,77	0,55	1,29	1,39

Tabela 10; Dados de CL (mm) x P4 (ng/mL) x FSH (mUI/mL) x LH (mUI/mL) animal 3042

Ordem	Data	CL (mm)	P4 (ng/mL)	FSH (mUI/mL)	LH (mUI/mL)
2	26/03/2015	15,40	0,84	0,01	1,51
3	27/03/2015	3,00	0,53	0,02	1,41
4	28/03/2015	4,50	0,39	0,02	1,32
5	29/03/2015	6,70	0,40	0,02	1,23
6	30/03/2015	8,90	0,54	0,02	1,32
7	31/03/2015	3,20	1,36	0,03	15,39
8	01/04/2015	4,30	2,76	0,03	10,34
9	02/04/2015	15,53	2,09	0,04	1,00
10	03/04/2015	17,91	2,10	0,08	1,07
11	04/04/2015	16,88	2,24	0,12	1,26
12	05/04/2015	16,25	3,20	0,12	5,53
13	06/04/2015	20,95	5,74	0,18	1,18
14	07/04/2015	16,89	4,39	0,25	1,11
15	08/04/2015	19,59	4,16	0,26	1,13
16	09/04/2015	18,35	4,73	0,27	1,10
17	10/04/2015	19,20	3,27	0,27	1,12
18	11/04/2015	20,47	0,41	0,28	1,07
19	12/04/2015	20,20	0,32	0,28	0,99
20	13/04/2015	15,26	0,28	0,28	1,07
21	14/04/2015	14,30	0,19	0,29	1,28
22	15/04/2015	12,45	0,04	0,29	1,12
23	16/04/2015	12,30	0,08	0,31	1,14
24	17/04/2015	12,10	0,31	0,32	1,14
25	18/04/2015	12,45	2,03	0,32	1,30
26	19/04/2015	15,05	3,12	0,33	1,29
27	20/04/2015	22,50	4,59	0,34	1,32
28	21/04/2015	18,15	4,18	0,34	1,36
29	22/04/2015	20,45	5,40	0,39	1,43
30	23/04/2015	21,85	5,80	0,40	1,34
31	24/04/2015	24,00	4,97	0,41	1,50
32	25/04/2015	23,60	7,55	0,42	3,13
33	26/04/2015	22,65	7,69	0,42	0,42
34	27/04/2015	22,75	7,41	0,44	2,83
35	28/04/2015	23,10	6,53	0,45	1,93
36	29/04/2015	21,93	3,75	0,57	4,39
37	30/04/2015	20,49	0,09	0,57	2,16
38	01/05/2015	21,72	0,08	0,59	1,82
39	02/05/2015	15,50	0,07	0,60	1,74
40	03/05/2015	13,07	0,12	0,61	1,67

Tabela 11: CL (mm) x P4 (ng/mL) x FSH (mUI/mL) x LH (mUI/mL) – Animal 3043

Ordem	Data	CL (mm)	P4 (ng/mL)	FSH (mUI/mL)	LH (mUI/mL)
1	25/03/2015	21,95	14,93	0,55	0,93
2	26/03/2015	19,94	9,30	0,64	0,97
3	27/03/2015	20,21	9,67	0,65	0,97
4	28/03/2015	19,08	13,73	0,86	0,99
5	29/03/2015	20,21	17,67	1,01	1,01
6	30/03/2015	22,55	15,96	1,03	1,05
7	31/03/2015	21,71	15,78	0,97	1,03
8	01/04/2015	19,20	10,20	0,89	0,97
9	02/04/2015	15,75	4,15	0,74	0,99
15	08/04/2015	17,00	4,52	0,29	1,04
16	09/04/2015	11,48	5,96	0,31	0,88
17	10/04/2015	17,64	10,93	0,58	1,09
18	11/04/2015	14,95	15,01	0,64	1,07
19	12/04/2015	17,00	14,54	0,75	0,99
20	13/04/2015	21,43	16,70	0,58	0,99
21	14/04/2015	24,04	16,90	0,32	1,00
22	15/04/2015	20,61	17,63	0,28	1,06
23	16/04/2015	20,14	22,41	0,27	1,11
24	17/04/2015	20,28	13,88	0,35	2,10
25	18/04/2015	21,25	9,86	0,42	1,19
26	19/04/2015	18,55	7,32	0,43	1,35
27	20/04/2015	20,45	4,29	0,45	1,50
28	21/04/2015	17,85	1,05	1,21	1,58
29	22/04/2015	17,25	0,99	0,47	1,54
30	23/04/2015	15,60	1,5	0,50	1,16
31	24/04/2015	13,70	3,79	0,60	1,22

Tabela 12: CL (mm) x P4 (ng/mL) x FSH (mUI/mL) x LH (mUI/mL) – Animal 3045

Ordem	Data	CL (mm)	P4 (ng/mL)	FSH (mUI/mL)	LH (mUI/mL)
6	30/03/2015	6,90	0,61	0,08	0,91
7	31/03/2015	14,50	0,63	0,09	0,89
8	01/04/2015	14,92	0,82	0,20	0,89
9	02/04/2015	13,56	0,82	0,01	0,89
10	03/04/2015	11,65	1,00	0,01	0,79
11	04/04/2015	9,38	2,56	0,05	0,78
12	05/04/2015	14,31	4,11	0,04	0,81
13	06/04/2015	14,43	4,56	0,12	0,99
15	08/04/2015	6,20	8,61	0,77	1,66
16	09/04/2015	11,59	6,88	0,8	1,88
17	10/04/2015	12,20	7,34	1,21	2,52
18	11/04/2015	16,30	7,66	2,30	5,47
19	12/04/2015	17,63	9,57	3,55	8,53
20	13/04/2015	19,96	2,70	5,47	12,77
21	14/04/2015	21,60	9,73	5,87	15,07
22	15/04/2015	22,10	8,56	5,56	14,19
23	16/04/2-15	19,95	8,45	5,15	12,94
24	17/04/2015	18,98	4,19	4,91	8,50
25	18/04/2015	20,15	0,90	3,85	8,39
26	19/04/2015	20,60	0,60	3,49	6,77
27	20/04/2015	20,50	0,23	2,67	6,47
28	21/04/2015	20,95	0,48	2,21	5,53
29	22/04/2015	21,05	0,47	1,84	3,96
30	23/04/2015	21,85	2,19	1,66	4,45
31	24/04/2015	18,59	3,08	1,59	3,86
32	25/04/2015	15,10	2,59	1,64	3,79
33	26/04/2015	12,85	5,27	2,01	4,57
34	27/04/2015	12,43	6,62	1,84	4,28
35	28/04/2015	13,15	6,68	1,77	3,97
36	29/04/2015	13,41	8,55	0,84	2,08
37	30/04/2015	14,01	8,72	0,64	1,66
38	01/05/2015	14,92	7,37	0,62	1,60
39	02/05/2015	14,99	7,08	0,60	1,23
40	03/05/2015	17,10	8,69	0,03	0,79
41	04/05/2015	18,80	2,61	0,06	1,31
42	05/05/2015	20,73	5,29	0	0,76
43	06/05/2015	21,89	5,29	0	0,76
44	09/05/2015	22,46	6,87	0,07	0,75