



## Importância e metodologias para mensuração dos esteroides sexuais em ruminantes *Importance and methodologies to measure sexual steroids progesterone and estradiol in ruminants*

**P.R. Lopes<sup>1,2,3</sup>, P.V. Furtado<sup>1</sup>, R.H.F.A. Souza<sup>1</sup>, C.A. Oliveira<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,  
Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Correspondência: [patriciarottalopes@gmail.com](mailto:patriciarottalopes@gmail.com)

### Resumo

As dosagens dos esteroides sexuais, como progesterona e estradiol, 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 quantificação desses esteroides foram desenvolvidos, porém cada metodologia analítica possui vantagens e limitações. O radioimunoensaio 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 nesse setor, aliada às exigências das legislações nacionais e internacionais em questões ambientais, tem aumentado a necessidade do desenvolvimento de novas técnicas sem a utilização de material radioativo. Uma possibilidade que se apresenta é a tecnologia xMAP-Multiplex®. Esta tecnologia apresenta vantagens sobre o radioimunoensaio, como ausência de radioatividade e detecção simultânea de hormônios, promovendo a diminuição do tempo gasto para dosagem e menor custo por amostra dosada. Porém, ainda sem estudos na endocrinologia reprodutiva de animais domésticos, torna-se necessária avaliá-la e validá-la para cada espécie.

**Palavras-chave:** estradiol, imunoensaio, progesterona.

### Abstract

*Quantifications of sexual steroids, such as progesterone and estradiol, because of their importance, have been widely used in many researches of animal's reproduction to study reproductive physiology, pathology and biotechnology. Several methods to quantify these steroids have been developed, but each analytical methodology has advantages and limitations. Radioimmunoassay is the most widely used method because of its efficiency and applicability in several species, but it has as major disadvantage the use of radioactive material. These concerns added to the requirements of national and international's legislations about environmental topics have increased the need to develop new techniques without the use of radioactive material. One new possibility is the xMAP-Multiplex® technology. This technology offers advantages over radioimmunoassay, such as absence of radioactivity and simultaneous detection of hormones, which decreases the time taken to quantify them and lower price for each quantified sample. Although, there are no studies at reproductive endocrinology at domestic animals and it is necessary to evaluate and validate it for each specie.*

**Keywords:** estradiol, immunoassay, progesterone.

### Introdução

As dosagens dos esteroides sexuais progesterona e estradiol, em diferentes matrizes biológicas, são amplamente empregadas em diversas pesquisas na área de reprodução animal e são de grande necessidade para a compreensão do ciclo estral e das características reprodutivas das diferentes espécies animais, além da avaliação do uso de biotécnicas reprodutivas, como mostram diversos trabalhos que vêm sendo realizados há vários anos em diferentes espécies (Knickerbockert et al., 1986; Alecozay et al., 1988; Badinga et al., 1992; Nunes et al., 2003; Barret et al., 2004; Abdulkarrem et al., 2012; Roth et al., 2012; Siqueira et al., 2012).

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

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 (Gil et al., 1999; Vignali, 2000; Furtado, 2007). As tendências da utilização de RIE, 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 para análise de multianálitos (Gil et al., 1999).

O objetivo deste artigo de revisão é compilar e descrever resumidamente as mais diversas linhas de pesquisa em reprodução de ruminantes, nas quais se utilizam a dosagem dos esteroides sexuais progesterona e estradiol, e fornecer aos veterinários e pesquisadores dessa área uma visão geral sobre as metodologias utilizadas, a fim de tornar mais compreensivos e claros os processos empregados.

### **Importância das dosagens de progesterona e estradiol no estudo da reprodução de animais domésticos**

Em reprodução bovina, as dosagens de progesterona e estradiol são empregadas em diversas linhas de pesquisa, como no estudo da endocrinologia reprodutiva da espécie (Sartori et al., 2004), na patologia reprodutiva (Wischnal et al., 2001), nos efeitos da nutrição sobre a reprodução (Rigolon et al., 2008), na manipulação e no controle do ciclo estral (Rathbone et al., 2001), bem como no estudo dos efeitos das biotécnicas de reprodução assistida desenvolvidas nas últimas décadas, como a aspiração folicular guiada por ultrassom para produção *in vitro* de embriões (Stubbings e Walton., 1995). O estudo da manipulação e do controle reprodutivo é importante para avaliar o uso de tratamentos hormonais no aumento da *performance* reprodutiva de vacas em anestro (Baruselli et al., 2004), para estudar diferentes protocolos de sincronização de estro e de ovulação para inseminação artificial em tempo fixo (Lima et al., 2007), nos protocolos de superovulação para transferência de embrião (Kafy e McGowan, 1997), para comparar taxas de fertilidade com o uso de diferentes dispositivos intravaginais de progesterona (Werven et al., 2013), entre outros.

Em ovinos, as dosagens de esteroides sexuais são empregadas, por exemplo, no estudo da endocrinologia reprodutiva (Rubianes e Ungerfeld, 1993), para avaliar a influência da latitude na estacionalidade reprodutiva (Souza et al., 2008), os efeitos dos estresses térmico e nutricional, as patologias no ciclo estral (Sejian et al., 2011; Hadeef et al., 2014), a eficiência de diferentes protocolos de sincronização de estro e a indução do estro e da ovulação (Leyva et al., 1998; Barret et al., 2008; Letelier et al., 2009), bem como o uso de implantes de melatonina (Loureiro, 2003), no estudo da dinâmica folicular (Bartlewski, et al., 1999) e da resposta superovulatória (Bartlewski et al., 2008).

Em bubalinos, pesquisas envolvendo dosagens de esteroides sexuais foram realizadas para estudar a endocrinologia reprodutiva na espécie (Abdulkareem et al. 2012), a dinâmica folicular (Baruselli et al., 1997), os protocolos de sincronização da ovulação (Baruselli, 2001), entre outros.

### **Metodologias imunoanalíticas**

A análise de esteroides geralmente é realizada por meio de dois tipos de métodos: os imunoensaios (IE), como o radioimunoensaio (RIE) e o enzimaensaio (EIE), e os físico-químicos, como os métodos cromatográficos. Os IE baseiam-se na reação antígeno-anticorpo e posterior leitura dessa reação, de forma a qualificar/quantificar o ensaio. A revelação pode ser, por exemplo, por reação enzimática (enzimaensaio) ou por emissão de radioatividade por meio de um isótopo (radioimunoensaio; Silva, 2007).

### **Radioimunoensaio**

Encontram-se na literatura diversos relatos na área de reprodução animal que utilizam a tecnologia do RIE para quantificar progesterona e estradiol sérico em diferentes espécies. Essa tecnologia revolucionou o entendimento da fisiologia e da endocrinologia em quase todas as espécies animais. A técnica de RIE 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 (Thorel e Larson, 1978; Senger, 2005; Furtado, 2007).

Para dosagem de estradiol em soro bovino há relatos de uso de *kits* comerciais (Bergfelt et al., 2000; Ayres, 2011), porém, nesses casos, foram utilizados métodos complexos de extração hormonal e preparação das amostras. Também há relatos de trabalhos com dosagem de estradiol em bovinos sem a utilização de *kits* comerciais. Nestes casos, são utilizados anticorpos, traçadores e padrões desenvolvidos por diferentes laboratórios e empresas, que diferem entre autores, como também diferem os métodos de extração hormonal e os protocolos (Knickerbocker et al., 1986; Turzillo e Fortune, 1990; Badinga et al. 1992; Burke et al., 2003; Wolfenson et al., 2004; Elmes et al., 2005).

O RIE constitui um grande avanço no campo dos IE quantitativos, seguido pelo surgimento do EIE. Apesar de ser o método mais sensível e usado rotineiramente nos laboratórios, o RIE possui algumas desvantagens, como: utilização de isótopos radioativos, sendo necessário que o laboratório tenha licença especial do CNEM, necessidade de instalações adequadas para manipulação e descarte, ocasionando perigo de exposição



à radiação, exigência de equipamentos caros para a detecção da radioatividade, como contadores de radiações gama. Ademais, o RIE permite a determinação de apenas um esteroide a cada análise, aumentando o custo e o tempo da análise por amostra dosada. No entanto, seu uso ainda é amplamente preconizado na medicina veterinária por ser um sistema aberto de dosagem, tornando-se fácil sua validação, já que, em um sistema aberto, o executor pode interferir e controlar as diferentes etapas do processo. Além disso, os resultados gerados são de alta confiabilidade (Gil et al., 1999; Furtado, 2007; Silva, 2007; Lima, 2012).

Com relação à dosagem de progesterona sérica, pode-se citar o RIE em fase sólida com o uso de *kits* comerciais de diferentes empresas sem necessidade de extração hormonal (Buruselli, 2001; Wischral et al., 2001; Sartori et al., 2004; El-Battawy et al., 2009; Letelier et al., 2009; Abdulkareem et al., 2012; Pinna et al., 2012; Hadeif et al., 2014). Alguns autores que utilizaram esses *kits* fizeram algumas modificações, ou seja, não seguiram as instruções do fabricante. Para citar como exemplo, Burke et al. (2003) utilizaram uma quantidade diferente de amostra, sem justificar o motivo, e Roth et al. (2012) prepararam a curva-padrão pela dissolução da progesterona em plasma de vaca ovariectomizada, obtendo resultados satisfatórios.

Diversos trabalhos mais antigos que estudaram a fisiologia reprodutiva básica de ovinos e bubalinos realizaram dosagem de progesterona sérica dessas espécies, sem *kits* comerciais e com extração hormonal, processos mais demorados e complexos (Rawlings et al., 1984; Alecozay et al., 1988).

### Enzimaimunoensaio

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

O princípio básico do EIE envolve um anticorpo ligado a uma superfície sólida, que, então, liga-se ao hormônio específico, presente na matriz biológica, a ser dosada, formando um complexo antígeno-anticorpo. Junto a esse complexo, é adicionado um segundo anticorpo, com exposição do componente enzimático para a superfície. Um substrato é, então, adicionado, reagindo com o componente enzimático e gerando uma cor, que é a base do sistema imunoenzimático (Senger, 2005).

Encontra-se na literatura veterinária o uso de EIE para dosagem de progesterona e estradiol séricos em diferentes espécies de animais domésticos, mediante a utilização de diferentes métodos e protocolos (Rasmussen et al., 1996; Sartori et al., 2004; Furtado, 2007; Roy e Prakash, 2009).

### Quimioluminescência

O método de quimioluminescência é uma técnica pela qual se obtém energia luminosa por meio de uma reação química. Esse imunoensaio utiliza um sistema que se baseia em unidades-teste, recoberto com anticorpo específico, como ensaio em fase sólida, servindo como recipiente para a reação imune, a incubação, a lavagem e o desenvolvimento do sinal luminoso (Sing et al., 1997). Essa técnica possui como vantagens: a praticidade de execução e a menor variação durante a pipetagem, pois o operador só precisa acrescentar a amostra nos tubos, sendo os demais reagentes adicionados pelo próprio equipamento; a não utilização de material radioativo; prazos maiores de validade e a possibilidade de execução de mais de um teste diferente em uma mesma amostra de uma única vez, oferecendo maior rapidez para obtenção dos resultados. Entretanto, algumas desvantagens são notadas, como menor sensibilidade e dificuldades no processo de validação do método, por ser um sistema fechado de análise, ou seja, um sistema automatizado, que não permite ao executor interferir nas diferentes etapas do processo (Lima, 2012).

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

### Tecnologia xMAP-Multiplex®

O xMAP-Multiplex® (*multiple analyte profile*) é uma tecnologia que foi desenvolvida pela empresa Luminex®. É um ensaio luminescente, assim como a quimioluminescência. Essa tecnologia envolve um processo que cora internamente microesferas magnéticas (*Beads*). São utilizadas misturas de dois ou três corantes fluorescentes. Utilizando-se uma proporção precisa desses fluorocromos, são criados até 100 conjuntos de microesferas com cores diferentes, que emitem diferentes intensidades de vermelho. Cada conjunto de microesferas está acoplado com anticorpo de captura específico, que se liga ao analito em questão. As



microesferas são combinadas em um único poço de reação e podem dosar até 100 analitos simultaneamente. Após a adição do anticorpo de detecção biotinizado, este se liga ao analito. O resultado final é amplificado por meio de incubação com o conjugado estreptavidina-ficoeritrina, emitindo sinal fluorescente que é, então, quantificado (Milliplex, 2013; Millipore, 2013).

As vantagens deste sistema quando comparado a outros imunoenaios é a otimização dos ensaios, pois faz uma avaliação múltipla de biomarcadores, o menor tempo para obtenção dos resultados por placa, a menor quantidade de amostra biológica, a maior amplitude da faixa de dosagem, o menor limite de detecção, a ausência de radiação e o menor custo por amostra dosada, estimada, pelo presente estudo, em 50%, no momento em que se escreve este artigo. (Milliplex, 2013; Millipore, 2013).

Não há relatos do uso desta técnica para dosagem de esteroides em animais domésticos, embora a empresa possua o *kit* comercial *Multi Species Steroid/Thyroid Hormone* (STTHMAG-21K; Millipore, Billerica, MA), que poderia ser testado.

### Validação hormonal

O desenvolvimento de um método analítico, a adaptação ou a implementação de um método envolvem processos de avaliação e validação que estimem sua eficiência na rotina do laboratório. O objetivo da validação consiste em demonstrar que o método analítico é adequado para o seu propósito (Brito et al., 2003). A validação de um método vai além de uma simples comparação entre resultados de uma mesma amostra dosada em diferentes métodos. Ela envolve processos complexos e extremamente elaborados (Furtado, 2007). A literatura define critérios que devem ser seguidos para 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; Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), 2012).

Um dos grandes entraves encontrados em dosagens de esteroides sexuais é a falta de padronização dos testes, tanto no que se refere à matriz biológica utilizada quanto ao processamento da amostra, à execução e ao método utilizado, principalmente quando o assunto em questão é um estudo epidemiológico, em que a quantificação de esteroides desempenha um papel fundamental e deve apresentar resultados confiáveis. Por esse motivo, deve ser feita, imprescindivelmente, pelos laboratórios, a validação, a fim de assegurar os resultados encontrados. Outra questão importante que deve ser levada em consideração é a sensibilidade do ensaio de estradiol, visto que este se encontra muitas vezes em níveis muito baixos na corrente sanguínea. Dosagens em duplicata devem sempre ser realizadas para avaliar o coeficiente de variação (Stanczyk et al., 2007).

### Considerações finais

A importância da dosagem de esteroides sexuais no estudo da reprodução animal é indiscutível. Conhecer e compreender as metodologias analíticas, incluindo suas vantagens e limitações, é fundamental para os pesquisadores e trabalhadores desta área. Fato é que, ao longo dos últimos anos, as ferramentas para análise das concentrações hormonais utilizadas por laboratórios para avaliação das funções hormonais vêm sofrendo modificações extremamente importantes e significativas e, com o avanço das diferentes tecnologias, novas oportunidades de ferramentas vão surgindo, sendo necessário estudá-las para serem empregadas de forma válida na medicina veterinária.

### Agradecimento

À agência Fapesp, pelo financiamento do projeto de pesquisa.

### Referências

- Abdulkareem TA, Eidan SM, Ishak MA, Al-Sharifi AAM, Alnimer MA, Passavant CW, Branen JR, Sasser RG.** Pregnancy-specific protein B (PSPB), progesterone and some biochemical attributes concentrations in the fetal fluids and serum and its relationship with fetal and placenta characteristics of Iraq riverine buffalo (*Bubalus bubalis*). *Anim Reprod Sci*, v.130, p.33-41, 2012.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária,** Brasil. Resolução nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. *Diário Oficial da União, Brasília, DF, 22 maio, 2012. Sec.1, p.93.*
- Alecozay AA, Selcer KW, Clark JR, Burns JM, Norman RL, Niswender GD, Leavitt WW.** Pattern of ovarian p4 secretion during the luteal phase of the ovine estrous cycle. *Biol Reprod*, v.39, p.287-294, 1988.
- Ayres SH.** O uso de FSH exógeno estimula o crescimento folicular final e a função luteínica de vacas Holandesas em lactação sincronizadas para Inseminação artificial em Tempo Fixo? 2011. 114f. Tese (Doutorado



- em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2011.
- Badinga I, Driancourt MA, Savio J D, Wolfenson D, Drost M, De La Sota RL, Thatcher WW.** Endocrine and Ovarian Responses associated with the first-wave dominant follicle in cattle. *Biol Reprod*, v.47, p.871-883, 1992.
- Barret DMW, Bartlewski PM, Batista-Artega M, Symington A, Rawlings NC.** Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to a single dose of 500 IU of eCG following a 12-day treatment with progesterone-releasing intravaginal sponges in the breeding and nonbreeding seasons in ewes. *Theriogenology*, v.61, p.311-327, 2004.
- Barret DMW, Bartlewski PM, Duggavathi R, Davies KL, Huchkowsky SL, EPP T, Rawlings, NC.** Synchronization of follicular wave emergence in the seasonally anestrous ewe: the effects of estradiol with or without medroxyprogesterone acetate. *Theriogenology*, v.69, p.827-836, 2008.
- Bartlewski PM, Alexander BD, King WA.** Ovarian and endocrine determinants of superovulatory responses in anestrous ewes. *Small Rumin Res*, v.75, p.210-216, 2008.
- Bartlewski PM, Beard AP, Cook SJ, Chandolia RK, Honoramooz A, Rawlings NC.** Ovarian antral follicular dynamics and their relationship with endocrine variables throughout oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. *J Reprod Fertil*, v.115, p.11-124, 1999.
- Baruselli PS.** Sincronização da ovulação com GnRH e prostaglandina F2 $\alpha$  para inseminação artificial em tempo fixo em bubalinos. 2001. 99f. Tese (Livre-docência em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2001.
- Baruselli PS, Gimenes LU, Sales JNS.** Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.205-211, 2007.
- Baruselli PS, Mucciolo RG, Visintin JA, Viana WG, Arruda RP, Madureira EH, Oliveira CA, Molero-Filho JR.** Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, v.47, p.1531-1547, 1997.
- Baruselli PS, Reis EL, Marques MO, Nassr LF, Bó GA.** The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. *Anim Reprod Sci*, v.82/83, p.479-486, 2004.
- Bergfelt DR, Kulick LJ, Kot K, Ginther OJ.** Follicular and hormonal response to experimental suppression of FSH during follicle deviation in cattle. *Theriogenology*, v.54, p.1191-1206, 2000.
- Brito NM, Amarante Junior OP, Polese L, Ribeiro ML.** Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Pesticidas: Rev Ecotoxicol e Meio Ambiente*, v.13, p.129-146, 2003.
- Burke CR, Mussard ML, Gasser CL, Grum DE, Day ML.** Estradiol benzoate delays new follicular wave emergence in a dose-dependent manner after ablation of the dominant ovarian in cattle. *Theriogenology*, v.60, p.647-658, 2003.
- El-Battawy KA, Sousa NM, Szenci O, Beckers JF.** Pregnancy-associated glycoprotein profile during the first trimester of pregnancy in Egyptian buffalo cows. *Reprod Domest Anim*, v.44, p.161-166, 2009.
- Elmes M, Green LR, Poore K, Newman J, Burrage D, Abayasekara DRE, Cheng Z, Hanson MA, Wathes DC.** Raised dietary n-6 polyunsaturated fatty acid intake increases 2-series prostaglandin production during labour in the ewe. *J Physiol*, v.592, pt. 2, p.583-592, 2005.
- Furtado PV.** 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.
- Gil ES, Kubota LT, Yamamoto YI.** Alguns aspectos de imunoenaios aplicados à química analítica. *Química Nova*, v.22, p.874-881, 1999.
- Hadef A, Miroud K, Kaidi R.** Effects of body condition and anaemia status on postpartum ovarian activity in ewes under two management systems in Algeria. *Livest Res Rural Dev*, v.26, n.219, 2014.
- Johannson A.** Heterogeneous enzyme immunoassay. In: Price C, Newmann D (Ed.). *Principles and practice of immunoassay*. New York: Macmillan, 1991. p.295-325.
- Kafi M, McGowan MR.** Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Anim Reprod Sci*, v.48, p.137-157, 1997.
- Knickerbockert JJ, Thatcher WW, Bazert FW, Drost M, Barron DH, Fincher KB, Roberts RM.** Proteins secreted by day-16 to -18 bovine conceptuses extended corpus luteum function in cows. *J Reprod Fertil*, v.77, p.381-391, 1986.
- Letelier CA, Contreras-Solis I, García-Fernández RA, Ariznavarreta C, Tresguerres JAF, Flores JM, Gonzales-Bulnes A.** Ovarian follicular dynamics and plasma steroid concentrations are not significantly different in ewes given intravaginal sponges containing either 20 or 40 mg of fluorogestone acetate. *Theriogenology*, v.71, p.676-682, 2009.
- Leyva V, Buckrell BC, Walton JS.** Regulation of follicular activity and ovulation in ewes by exogenous progesterone. *Theriogenology*, v.50, p.395-419, 1998.
- Lima HLS.** 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.
- Lima FPC, Marques Jr AP, Douglas RH, Hourri Neto M.** Concentração sérica de progesterona em bezerras da raça Nelore e mestiças tratadas com progesterona em veículo de liberação lenta. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.59, p.200-204, 2007.
- Loureiro MFP.** Indução do estro por implante de melatonina em ovinos da raça Suffolk. 2003. 68f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2003.
- Milliplex.** Luminex Meeting 2013, Barueri, SP. Barueri, SP: Luminex Corporation, 2013. Folheto de divulgação.
- Millipore.** Steroid/thyroid hormone magnetic bead panel. Billerica, MA, USA: EMD Millipore/Millipore Corporation, 2013. Folheto de divulgação.
- Nunes CGV, Costa EP, Oliveira RFM, Donxele JL, Nunes RV, Carvalho GR.** Efeito do acondicionamento térmico ambiental sobre o desempenho reprodutivo da fêmea suína. *Rev Bras Zootec*, v.32, p.854-863, 2003.
- Pinna AE, Brandão FZ, Cavalcanti AS, Borges AM, Souza JMG, Fonseca JF.** Reproductive parameters of Santa Inês ewes submitted to short-term treatment with re-used progesterone devices. *Arq Bras Med Vet Zoo*, v.64, p.333-340, 2012.
- Rasmussen FE, Wiltbank MC, Christensen JO, Grummer RR.** Effects of fenprostalene and estradiol-17 $\beta$  benzoate on parturition and retained placenta in dairy cows and heifers. *J Dairy Sci*, v.79, p.227-234, 1996.
- Rathbone MJ, Kinder JE, Fike K, Kojima F, Clopton D, Ogle CR, Bunt CR.** Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system design for the control of the estrous cycle in cattle. *Adv Drug Deliv Rev*, v.50, p.277-320, 2001.
- Rawlings NC, Jeffcoate IA, Rieger DL.** The influence of estradiol-17 $\beta$  and progesterone on peripheral serum concentrations of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in ovariectomized ewe. *Theriogenology*, v.22, p.473-488, 1984.
- Rigolon LP, Prado IN, Cavalieri FLB, Negrão JA, Silva RR, Marques JA.** Níveis de ingestão de matéria seca sobre metabólitos e hormônios circulantes e hormônios foliculares em novilhas de corte. *Rev Bras Saúde Prod Anim*, v.9, p.367-383, 2008.
- Roth Z, Biran D, Lavon Y, Dafni I, Yakobi S, Braw-Tal R.** Endocrine milieu and developmental dynamics of ovarian cysts and persistent follicles in postpartum dairy cows. *J Dairy Sci*, v.95, p.1729-1737, 2012.
- Roy KS, Prakash BS.** Plasma progesterone, oestradiol-17 $\beta$  and total oestrogen profiles in relation to oestrous behavior during induced ovulation in Murrah buffalo heifers. *J Anim Physiol Anim Nutr*, v.93, p.486-495, 2009.
- Rubianes R, Ungerfeld R.** Uterine involution and ovarian changes during early post-partum in autumn-lambing corriedale ewes. *Theriogenology*, v.40, p.365-372, 1993.
- Sartori R, Haughian JM, Shaver RD, Rosa GJM, Wiltbank MC.** Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of holstein heifers and lactating cows. *J Dairy Sci*, v.87, p.905-920, 2004.
- Sejian V, Maurya VP, Naqvi SMK.** Effect of thermal stress, restricted feeding and combined stresses (thermal stress and restricted feeding) on growth and plasma reproductive hormone levels of Malpura ewes under semi-arid tropical environment. *J Anim Physiol Anim Nutr*, v.95, p.252-258, 2011.
- Senger PL.** Pathways to pregnancy and parturition. 2.ed. Pullman, USA: Current Conceptions Inc., 2005. 373p.
- Silva CA.** Estudos fundamentais e aplicações envolvendo hormônios esteroides por meio de eletroforese capilar. 2007. 171f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2007.
- Simplicio AA, Freitas VJF, Fonseca JF.** Biotécnicas da reprodução como técnicas de manejo reprodutivo em ovinos. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.234-246, 2007.
- Sing AK, 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. *J Vet Diagn Invest*, v.9, p.261-288, 1977.
- Siqueira AP, Oliveira RMP, Silva Filho JM, Palhares MS, Fonseca JF, Bruschi, JH, Cruschi MCM.** Progesterona plasmática e fertilidade de fêmeas caprinas submetidas à sincronização do estro com prostaglandina F2 $\alpha$ . *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.64, p.305-310, 2012.
- Souza MIL, Uribe-Velásquez LL, Oba E, Sá Filho OG, Ramos OA.** Secreção de esteroides ovarianos, em ovelhas mestiças de raças exploradas para corte, em distintos momentos reprodutivos, no Estado de São Paulo. *Ciênc Anim Bras*, v.64, p.305-310, 2008.
- Stanczyk FZ, Lee JS, Santen RJ.** Standardization of steroid hormone assays: why, how and when? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v.16, p.1713-1719, 2007.
- Stubbings RW, Walton JS.** Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in Holstein cows. *Theriogenology*, v.43, p.705-712, 1995.
- Tahir MZ, Thoumire S, Raffaelli M, Grimard B, Reynaud K, Chastand-Maillard S.** Effect of blood handling conditions on progesterone assay results obtained by chemiluminescence in the bitch. *Domest Anim Endocrinol*, v.45, p.141-144, 2013.
- Thorel JI, Larson SM.** Radioimmunoassay and related techniques. Saint Louis: Mosby Company, 1978. 289p.



- Turzillo AM, Fortune JE.** Suppression of the secondary FSH surge with bovine follicular fluid is associated with delayed ovarian follicular development in heifers. *J Reprod Infertil*, v.89, p.643-653, 1990.
- Vignali DAA.** Multiplexed particle-based flow cytometric assays. *J Immunol Methods*, v.243, p.243-255, 2000.
- Volkman DH.** The effects of storage time and temperature and anticoagulant on laboratory measurements of canine blood progesterone concentration. *Theriogenology*, v.66, p.1583-1586, 2006.
- Werven TV, Waldeck F, Souza AH, Floch S, Englebienne M.** Comparison of two intravaginal progesterone releasing devices (PRID-Delta vs CIDR) in dairy cows: blood progesterone profile and field fertility. *Anim Reprod Sci*, v.138, p.143-149, 2013.
- Wischril A, Verreschi ITN, Lima SB, Hayashi LF, Barnabe RC.** Pre-parturition profile of steroids and prostaglandin in cows with or without foetal membrane retention. *Anim Reprod Sci*, v.67, p.181-188, 2001.
- Wolfenson D, Inbar G, Roth Z, Kaim M, Bloch A, Braw-Tal R.** Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. *Theriogenology*, v.62, p.1042-1055, 2004.
-