

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS AGROPECUÁRIAS
LABORATÓRIO DE REPRODUÇÃO E MELHORAMENTO GENÉTICO ANIMAL

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE PROGESTERONA PLASMÁTICO EM OVINOS POR
QUIMIOLUMINESCÊNCIA DURANTE A GESTAÇÃO**

Campos dos Goytacazes - RJ

Fevereiro /2012

HUGO LOUVAIN DA SILVA LIMA

**AValiação DO PERFIL DE PROGesterona PLasmático EM OVINOS POR
QUIMIOluminescência DURANTE A GEstação**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, área de concentração em Melhoramento e Biotecnologia da Reprodução.

Orientadora: Professora Maria Clara Caldas Bussiere

Coorientador: Professor Ângelo José Burla Dias

Campos dos Goytacazes - RJ

Fevereiro/2012

HUGO LOUVAIN DA SILVA LIMA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE PROGESTERONA PLASMÁTICO EM OVINOS POR
QUIMIOLUMINESCÊNCIA DURANTE A GESTAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, área de concentração em Melhoramento e Biotecnologia da Reprodução.

Apresentado em 24 de fevereiro de 2012

Comissão examinadora:

Prof. Celia Raquel Quirino (Doutora, Ciência Agrárias)

Prof. Anneliese de Souza Traldi (Doutora, Patologia Experimental e Comparada)

**Prof. Ângelo José Burla Dias (Doutor, Biociências e Biotecnologia)
(Coorientador)**

**Prof. Maria Clara Caldas Bussiere (Doutora, Ciência)
(Orientadora)**

RESUMO

A mensuração da progesterona (P_4) plasmática em ovelhas é um confiável indicador da função do corpo lúteo e, com isso, é possível identificar e monitorar os diferentes estádios reprodutivos da fêmea. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o perfil de progesterona plasmático após a sincronização do estro e ao longo da gestação em dez ovelhas da raça Santa Inês, por um sistema automatizado de dosagem de P_4 por quimioluminescência. Os animais tiveram o estro sincronizado e foram acasalados por monta natural controlada. As amostras de plasma para dosagem de P_4 foram colhidas após a sincronização do ciclo estral e durante a gestação. A dosagem da P_4 foi determinada por imunoenensaio competitivo, o qual usa a quimioluminescência direta (Immulite 1, Siemens), com uma sensibilidade analítica de 0,2 ng/mL. Foi considerado D0 o dia da manifestação do estro. O diagnóstico de gestação foi realizado no D25 por meio da ultrassonografia transretal, classificando os animais em não-prenhes (NP, n = 4), e prenhes (P, n = 6). A concentração de P_4 plasmática no estro e no pós parto, em todos os animais experimentais, variou entre 1,20 ng/mL e 1,30 ng/mL. A concentração plasmática de P_4 permaneceu baixa e sem diferença significativa ($p > 0,05$) do D0 ao D2 nos animais NP e P (D0 1,20 \pm 0,17; 1,23 \pm 0,36 ng/mL, D1 1,23 \pm 0,15; 1,45 \pm 0,34 ng/mL e D2 1,00 \pm 0,61; 1,60 \pm 0,10, respectivamente). No D9, houve uma elevação da concentração de P_4 nos animais dos dois grupos NP e P (3,00 \pm 1,13; 4,43 \pm 0,47 ng/mL, respectivamente). Do D16 ao D18, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre NP e P (D16 - NP 2,67 \pm 1,25 ng/mL, e P 4,65 \pm 0,82 ng/mL; D17 NP 2,17 \pm 1,44 ng/mL e P 5,40 \pm 2,49 ng/mL; e D18 NP 2,17 \pm 1,67 ng/mL, e P 4,80 \pm 1,39 ng/mL). Os animais gestantes permaneceram com a concentração plasmática de P_4 elevada por toda a gestação. Do D9 (4,43 \pm 0,47 ng/mL) ao D96 (4,70 \pm 1,70 ng/mL), não houve diferença marcante na concentração de P_4 . A concentração plasmática de P_4 máxima foi no D132 (11,87 \pm 4,31 ng/mL), diminuindo gradativamente até o parto (1,30 \pm 0,28 ng/mL) e permanecendo basal após o parto. A técnica de quimioluminescência se mostrou viável para avaliar o perfil de progesterona plasmática em ovinos.

Palavras-chave: progesterona plasmática, quimioluminescência, ovelhas, gestação.

ABSTRACT

The measurement of progesterone (P₄) in sheep plasma is a reliable indicator of corpus luteum function, it is possible to identify and monitor the different physiological stages of the female. This study aimed to evaluate the profile of plasma progesterone after synchronization of oestrus and during pregnancy in 10 ewes Santa Ines, and the possibility of early pregnancy diagnosis by an automated chemiluminescence system. The animals had estrus synchronized and mated by natural mating. Plasma samples for P₄ were harvested after synchronization and during pregnancy. The dosage of P₄ was determined by competitive immunoassay using direct chemiluminescence (Immulite 1, Siemens), with an analytical sensitivity of 0.2 ng/mL. D0 was considered the day of onset of estrus. Pregnancy diagnosis was performed at D25 by transrectal ultrasonography, classifying animals in non-pregnant (NP, n = 4) and pregnant (P, n = 6). The plasma concentration of the P₄ and postpartum estrus in all animals was greater than 1 ng / ml. Plasma P₄ remained low and no significant difference (p > 0.05) from D0 to D2 in both NP and P D0 1.20 ± 0.17, 1.23 ± 0.36 ng/mL, D1 1.23 ± 0.15, 1.45 ± 0.34 ng/mL and D2 2.00 ± 0.61 1.60 ± 0.10 ng/mL, respectively. D9 there was an increase in both groups (NP, P) (3.00 ± 1.13, 4.43 ± 0.47 ng/mL, respectively NP and P). From D16 to D18 was significant difference (p < 0.05) between NP and P D16 (NP 2.67 ± 1.25 ng/mL, P and 4.65 ± 0.82 ng/mL), D17 (NP 2.17 ± 1.44 ng/mL, and P 5.40 ± 2.49 ng/mL) and P18 (NP 2.17 ± 1.67 ng/mL, and P 4.80 ± 1.39 ng/mL.). The animals P remained with high plasma concentrations of P₄ throughout gestation. Of D9 (4.43 ± 0.47 ng/mL) D96 (4.70 ± 1.70 ng/mL) showed no significant variations in the concentration of P₄. The maximum plasma concentration of P₄ was the D132 (11.87 ± 4.31 ng/mL) decreased until birth (1.30 ± 0.28 ng/mL) and remained low after the birth. The chemiluminescence is possible to evaluate the profile of sheep plasma P₄.

Keywords: plasma progesterone, chemiluminescence, sheep, pregnancy.

LISTA DE FIGURAS**Página**

- Fig. 1 – Deslocamento da concentração plasmática de P_4 de ovelhas da Raça Santa Inês, mensuradas por quimioluminescência apresentando os resultados observados e esperados em diferentes diluições (16/16, 8/16, 4/16, 2/16, 1/16).....26
- Fig. 2 – Gráficos da concentração de progesterona plasmática individual dos animais diagnosticados como não-prenhes (NP), mensurados por quimioluminescência.(A) animal 1, (B) animal 2 e (C) animal 3.....27
- Fig. 3 – Gráficos da concentração de progesterona plasmática individual dos animais diagnosticados como prenhes (P), mensurada por quimioluminescência; (A) animal 4; (B) animal 5; (C) animal 6; (D) animal 7; (E) animal 8; (F) animal 9.....28
- Fig. 4 – Gráfico da média da concentração de progesterona plasmática das ovelhas não-prenhes (NP), após a sincronização do estro mensurada por quimioluminescência.....29
- Fig. 5 – Gráfico da média da concentração de progesterona plasmática mensurada por quimioluminescência das ovelhas prenhes (P) durante a gestação.....30

SUMÁRIO

RESUMO	4
ABSTRACT	5
1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 A RAÇA SANTA INÊS	10
2.2 CICLO ESTRAL	10
2.3 SAZONALIDADE	12
2.4 RECONHECIMENTO MATERNO DA PRENHEZ	13
2.5 DOSAGEM DE PROGESTERONA	14
2.6 QUIMIOLUMINESCÊNCIA	16
3. OBJETIVO	21
3.1 OBJETIVO GERAL	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
TRABALHO	22
REFERÊNCIAS	35

1 – INTRODUÇÃO

À medida que ocorre uma mudança do perfil da ovinocultura nas regiões sudeste e centro-oeste para um sistema de produção tecnificado e mais rentável, com característica intensivista, a eficiência reprodutiva tornar-se um fator indispensável. Dentro desta perspectiva, há ampla necessidade de se assistir a reprodução, seja para permitir o aumento da eficiência reprodutiva e produtiva dos rebanhos, seja para a multiplicação mais eficiente de genótipos superiores (FONSECA, 2005). Neste contexto, aumenta-se a demanda por pesquisas na área das biotécnicas reprodutivas, sendo as caracterizações das diferentes fases do ciclo estral e o diagnóstico da gestação condições básicas para a aplicação das biotécnicas reprodutivas (ZARKAWI e SOUKOUTI et al., 2001; SIMPLÍCIO et al., 2007).

A mensuração da progesterona (P_4) plasmática em ovelhas é um confiável indicador da função do corpo lúteo e, com isso, é possível identificar e monitorar os diferentes estádios reprodutivos da fêmea (THIMONIER, 2000). A progesterona é um hormônio esteroide que é especialmente importante na preparação do útero para a implantação do embrião e na manutenção da gestação (REN et al., 2008). A concentração de progesterona plasmática determinada em ovelhas, 18 dias após a inseminação artificial por enzimaímmunoensaio (EIA) e radioímmunoensaio (RIA), demonstrou ter uma alta acurácia para o diagnóstico de gestação (SUSMEL e PIASENTIER, 1992; KAREN et al., 2003). Entretanto, a maioria dos estudos tem sido limitada às primeiras semanas de gestação. O perfil plasmático de P_4 pode ser usado para monitorar a gestação, pois as perdas embrionárias em ovelhas resultam de baixa concentração de progesterona plasmática (MUKASA e VIVIANI, 1992; RANILLA et al., 1994).

Alguns métodos têm sido descritos para a mensuração da P_4 plasmática, tais como radioímmunoensaio e enzimaímmunoensaio (BOSCOS et al., 2003; KAREN et al., 2003). Entretanto, existem algumas desvantagens: o método de RIA tem problemas associados com o marcador radioativo, como nocividade para o operador, além de baixa estabilidade do marcador (radioisótopo); o EIA não tem a mesma sensibilidade do RIA e pode não atender a exigência de uma avaliação precisa de P_4 em baixa concentração (REN et al., 2008).

A mensuração da P_4 plasmática por quimioluminescência é o método utilizado na rotina laboratorial na medicina humana para superar as desvantagens do RIA, mantendo a

especificidade e sensibilidade (RICHARDSON et al., 1985). Entretanto, não há muitos trabalhos publicados utilizando a técnica de quimioluminescência na medicina veterinária, semelhante ao que ocorre com a metodologia do RIA, havendo a necessidade de se fazer mais estudos para validar a dosagem de progesterona plasmática por quimioluminescência em animais (CIARLINI et al., 2002).

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – A RAÇA SANTA INÊS

Dentre as raças de ovinos criadas no Brasil, destaca-se a Santa Inês, raça nativa deslanada resultante do cruzamento intercorrente das raças Bergamácia, Morada Nova, Somalis e outros ovinos nativos sem raça definida (SANTOS, 2003; SANTOS, 2007; VERÍSSIMO et al., 2009; ABSI, 2012). O porte, o tipo de orelhas, o formato da cabeça e os vestígios de lã evidenciam a participação da raça Bergamácia, bem como a ausência de lã e as pelagens correspondem à Morada Nova. A participação da raça Somalis é evidenciada pela apresentação de pequeno acúmulo de gordura na base da cauda (SANTOS, 2003). O peso dos machos varia de 80 a 120 Kg e as fêmeas podem variar de 60 a 90 Kg. São animais rústicos e precoces, adaptáveis a qualquer sistema de criação e pastagem, e se integram com facilidades às mais diversas regiões do país (SANTOS, 2007; ABSI, 2012).

Por ser uma raça originária de uma região de clima tropical não sofre efeito da sazonalidade na reprodução, sendo poliéstrica contínua em condições sanitárias apropriadas e com planejamento nutricional adequado (SIMPLÍCIO E SANTOS, 2005). A raça apresenta elevados índices de eficiência reprodutiva, tais como: idade à puberdade zootécnica de 10 meses; idade ao primeiro parto de 16 meses; fertilidade ao parto de 86,9%; prolificidade de 1,24 e sobrevivência do nascimento até o desmame de 80% (SANTOS, 2007).

2.2 – CICLO ESTRAL

O ciclo estral compreende o intervalo entre dois estros consecutivos, sendo regulado por mecanismos endócrinos e neuroendócrinos, mediados principalmente pelo GnRH, pelas gonadotrofinas hipofisárias (FSH e LH), esteroides e fatores de crescimento secretados pelos ovários, e prostaglandinas, principalmente de origem uterina (SOUZA et al., 1997; FONSECA e BRUSCHI, 2005).

Assim como nas vacas, os folículos antrais ovarianos das ovelhas crescem num padrão semelhante a ondas. Em ovinos, ocorrem três a quatro ondas a cada ciclo estral. Durante cada onda, ao redor de 7 a 11 folículos pequenos (3 mm em diâmetro) entram numa fase de recrutamento que dura aproximadamente 3 dias. Em seguida, de 1 a 5 folículos crescem rapidamente (seleção) e atingem um diâmetro ovulatório (>6mm, folículo dominante), suprimindo o crescimento (dominância) de outros folículos (subordinados), e prevenindo o surgimento de uma nova onda folicular. Os folículos subordinados entram em atresia. O maior ou os maiores folículos da onda podem ovular ou regredir, e uma nova onda folicular emerge com um intervalo entre ondas de aproximadamente 5 dias. Em todas as ovelhas, a última onda folicular do período entre ovulações contém folículos ovulatórios. O crescimento médio do folículo ovulatório é em torno de 1,1 mm por dia (BARTLEWSKI et al., 1999; DUGGAVATHI et al., 2004; SEEKALLU et al., 2009; MENCHACA et al., 2010).

Cada onda de crescimento folicular é estimulada por um aumento na secreção de FSH causado pela regressão do folículo dominante da onda prévia (BABY e BARTLEWSKI, 2011). Subsequentemente, o folículo dominante adquire receptores para LH nas células da granulosa para continuar o próprio desenvolvimento e, além disso, secreta inibina A e estradiol, suprimindo assim a secreção de FSH (BARTLEWSKI et al., 1999; DUGGAVATHI et al., 2004; MENCHACA et al., 2010).

A fase terminal de desenvolvimento folicular, culminando em ovulação, está sob o controle do hormônio luteinizante (LH). Picos de LH atingem valores máximos no plasma sanguíneo apenas durante a fase folicular do ciclo estral, estimulados pela alta concentração de estradiol (BARTLEWSKI et al., 1999; SEEKALLU et al., 2009).

Em qualquer etapa do ciclo estral dos ovinos, o maior folículo não-atrésico é a fonte principal de estradiol. Um valor máximo de estradiol ocorre no dia que precede a ovulação, no momento do estro, mas também durante o ciclo, nos dias 3-4 e nos dias 6-9, (BARTLEWSKI et al., 1999; DUGGAVATHI et al., 2004; WU et al., 2010).

A duração do estro varia de uma fêmea para a outra dentro da mesma espécie. Isso também ocorre com o momento da ovulação, que ocorre de 24 a 30 horas após o pico de LH na maior parte das ovelhas (12 a 16 horas após o estro). Algumas ovelhas podem apresentar intervalos entre ovulações tão longos quanto 23 dias, que podem ser relacionados com uma vida útil prolongada do CL de aproximadamente 16 dias. O intervalo médio entre ovulações é de 17 dias (BARTLEWSKI et al., 1999; SEEKALLU et al., 2010).

Folículos da última onda do ciclo estral em ovelhas podem ovular e formar um corpo lúteo saudável, caracterizando o início da fase luteínica do ciclo estral (DUGGAVATHI et al.,

2004). As células luteínicas esteroidogênicas do corpo lúteo plenamente maduro sintetizam e liberam progesterona na circulação sistêmica, elevando a concentração de progesterona no plasma sanguíneo, exercendo assim retroalimentação negativa no eixo hipotalâmico-hipofisário, e impedindo o pico de secreção de LH que seria responsável pela maturação final do folículo dominante e pela ovulação (BAIRD et al., 1975; SALLES e ARAÚJO. 2010). A meia-vida do CL na ovelha é dependente de um sistema fechado útero-ovário. A secreção de progesterona pelo CL é responsável para preparar o útero e capacitá-lo para ser um ambiente adequado para o desenvolvimento de um conceito. Na ausência da fertilização ou na incapacidade do conceito em sinalizar sua existência no útero, pulsos de $PGF_{2\alpha}$ são liberados pelas células endometriais para promover a luteólise, determinando o término do ciclo estral e gerando um novo estro. A $PGF_{2\alpha}$ é o hormônio luteolítico uterino na maioria dos mamíferos (BAIRD et al., 1975; SALLES e ARAÚJO. 2010).

Na ovelha, o desenvolvimento folicular continua inalterado por toda a fase luteal, com folículos alcançando um diâmetro de aproximadamente 5 mm antes de tornarem-se atrésicos. Quando a regressão luteal ocorre espontaneamente ou por administração de $PGF_{2\alpha}$ há sempre pelo menos um folículo pronto para maturar e ovular (BAIRD et al., 1975).

2.3 – SAZONALIDADE

As raças de ovinos originárias de climas temperados em médias ou altas latitudes se reproduzem sazonalmente, no transcorrer do período de dias curtos. A estacionalidade reprodutiva é bem marcada e o aparecimento do estro clínico é controlado pelo fotoperíodo (SIMPLÍCIO e SANTOS, 2005). Das muitas variáveis ambientais disponíveis, o fotoperíodo é o principal sincronizador para os animais de reprodução sazonal, porque, ao contrário de outras variáveis climáticas, tais como temperatura e chuvas, o ciclo sazonal da duração do dia é constante entre os anos (ROSA e BRYANT, 2003). Entretanto, em regiões de clima tropical, onde a luminosidade não sofre grandes variações ao longo do ano, as ovelhas nativas ou adaptadas apresentam estros e ovulações ao longo de todos os meses do ano, sendo consideradas poliéstricas contínuas (SIMPLÍCIO e SANTOS, 2005).

A sazonalidade reprodutiva da ovelha é caracterizada por mudanças no sistema endócrino, no comportamento e na ovulação, dando origem a uma alternância anual entre os dois períodos, reprodutivo e anestro sazonal. Durante todo o período de anestro, os níveis de

progesterona permanecem baixos, com uma baixa pulsatilidade das gonadotrofinas (BARRELL et al., 1992). Seguem, porém, ocorrendo as ondas de desenvolvimento dos folículos, que são sensíveis à estimulação da gonadotrofina, e a ovulação pode ocorrer se as ovelhas forem induzidas com um prévio tratamento com progestágeno e aplicação de GnRH exógeno (BARTLEWSKI et al., 2001; KILLIAN et al., 1985). A alternância para o período reprodutivo é dependente do fotoperíodo, visto que a melatonina é secretada durante as horas de ausência de luz pela glândula pineal, e o aumento do tempo de secreção determina uma modificação na sensibilidade do eixo hipotalâmico-hipofisário aos estrógenos, alterando a sensibilidade e a geração de pulsos de GnRH, com consequente modificação da secreção pulsátil de LH, desencadeando a ovulação (ROSA e BRYANT, 2003).

2.4 – RECONHECIMENTO MATERNO DA PREENHEZ

Quando ocorre um ciclo estral fisiológico, este é geralmente associado com uma ou mais ovulações. O CL formado após a luteinização do folículo ovulatório secreta uma elevada quantidade de P_4 que será responsável pela manutenção da prenhez, caso ocorra a fecundação (NEVES et al., 2008). Por volta do dia 14 após a ovulação, o blastocisto sintetiza o interferon-tau ($INF\tau$) que inibe a síntese de $PGF_{2\alpha}$, impedindo assim a luteólise e, conseqüentemente, a diminuição da síntese de P_4 (SPENCER et al., 2004). Além disso, no início da gestação, há uma supressão do crescimento de folículos antrais mediada principalmente pelo concepto. O estradiol produzido pelo folículo ovariano é importante para iniciar a síntese uterina de $PGF_{2\alpha}$ e, conseqüentemente, a luteólise. Assim, este poderia ser um mecanismo local adicional no reconhecimento materno da gestação em ovinos (BARTLEWSKI et al., 2000).

Os efeitos antiluteolíticos do $INF\tau$ são traduzidos a partir da sua ação inibitória sobre a expressão dos genes que codificam, para os receptores endometriais de ocitocina e estrógenos, hormônios que atuam sobre as células endometriais, estimulando-as a produzirem $PGF_{2\alpha}$. Dessa forma, o $INF\tau$ regula a produção de $PGF_{2\alpha}$. O $INF\tau$ não é observado na circulação periférica de fêmeas gestantes, sendo sua ação localizada apenas no útero (SPENCER et al., 2007).

O nítido aumento na expressão do gene do $INF\tau$ ocorre do 10º ao 25º dia, com seu pico de produção entre o 14º e o 16º dia após a fecundação, coincidindo com a fase morfológica de blastocisto que, nesse período, passa da forma esférica para a forma

filamentosa. Por isso, a produção de $\text{INF-}\tau$ parece ser mais dependente do desenvolvimento embrionário do que propriamente do dia da gestação. Esse processo é extremamente influenciado pela concentração plasmática de P_4 (SPENCER et al., 2004; NEVES et al., 2008; SPENCER et al., 2007).

O embrião começa a implantar-se no 14º dia do ciclo, quando a vesícula coriônica está desenvolvida o suficiente para entrar em contato estreito com o epitélio uterino no momento da implantação. A partir da implantação, todas as trocas metabólicas serão feitas por meio da placenta do tipo cotiledonária, cuja fixação ocorre nas carúnculas endometriais. Na ovelha, a placenta produz progesterona em quantidade suficiente para a manutenção da prenhez, tornando-se a principal fonte de P_4 a partir 50º dia (NODEN e De LAHUNTA, 1985; NEVES et al., 2008).

2.5 – DOSAGEM DE PROGESTERONA

A concentração de progesterona plasmática varia dependendo do estado fisiológico da fêmea. Durante o anestro, a concentração plasmática de P_4 é geralmente baixa. Durante a estação de reprodução, os níveis de P_4 são caracterizados por uma alternância de valores periovulatórios baixos e altos na fase lútea. Nas ovelhas gestantes, a concentração plasmática de P_4 segue uma tendência semelhante à fase lútea do ciclo estral, porém os níveis de progesterona permanecem altos por toda a gestação, sendo, no início, apenas produzida pelo CL e, a partir do 50º dia, passa a ser produzida principalmente pela placenta (THIMONIER, 2000), diferentemente da cabra, cuja produção placentária de progesterona não é significativa (BUTTLE, 1978).

A concentração de progesterona plasmática pode ser utilizada para monitorar a atividade reprodutiva em ovelhas (COELHO et al., 2006), cabras (CHEMINEAU et al., 1982) e novilhas (OYEDIPE et al., 1986). As ovelhas são consideradas em anestro se nunca excederem a concentração plasmática de progesterona de 1 ng/mL durante mais de duas amostras consecutivas ou durante um período de 10 dias. A concentração de P_4 plasmática mostra um modelo anual diferente de secreção entre as ovelhas da raça Santa Inês, Romney Marsh e Suffolk, mantidas em fotoperíodo natural. Não há variação sazonal nas concentrações plasmáticas de P_4 para as fêmeas da raça Santa Inês, o padrão de secreção é constante ao

longo de todo o ano. Entretanto, o padrão de secreção de P₄ das ovelhas das raças Romney Marsh e Suffolk varia com a estação do ano (COELHO et al., 2006).

A concentração de progesterona plasmática em ovinos, dosada por ensaio imunoenzimático (MUKASA e VIVIANI, 1992) e radioimunoensaio (RANILLA et al., 1994) apresenta-se basal (<1 ng/mL) no estro, aumentando e permanecendo elevada durante toda a gestação, alcançando concentração máxima no terço final e, nas últimas três semanas, ocorre uma diminuição que se acentua nos últimos 3 dias de gestação, para alcançar níveis basais 2 dias após o parto (MUKASA e VIVIANI, 1992; RANILLA et al., 1994; BOSCO et al., 2003; ALEXANDER et al., 2008; GANAIE et al., 2009). Mukasa e Viviani (1992) não relataram correlação entre a concentração de P₄ durante a gestação e o peso, o sexo ou o número de fetos. Entretanto, Ranilla et al. (1997) e Karen et al. (2006) relataram que as ovelhas gestantes de gêmeos apresentam maior concentração de P₄ plasmática da 12^a a 20^a semana de gestação do que as que gestam apenas um cordeiro. O peso ao nascimento do cordeiro pode estar correlacionado com a concentração de P₄ plasmática da 9^a a 19^a semana de gestação (RANILLA et al., 1997).

Em cabras, a concentração de progesterona plasmática se mantém em níveis basais durante o cio, aumentando durante a fase lútea (KHANUM et al., 2008). A concentração média de P₄ durante a fase lútea, após estros induzidos, é maior que após estros naturais, devido ao maior número de CL (CHEMINEAU et al., 1982). Durante a gestação, a concentração de progesterona plasmática é mantida alta com uma larga variação (2,6 a 10,8 ng/mL), tendo um padrão semelhante entre as raças (KHANUM et al., 2008). Durante a gestação, a concentração média de P₄ tem variações semanais entre os animais e entre o período de gestação, mas não tem variações significativas entre as raças ou pelo número de fetos (SOUZA et al., 1999).

A concentração de P₄ plasmática é uma variável clássica para diagnóstico de prenhez em várias espécies de mamíferos (BOSCO et al., 2003). Além de ser uma ferramenta importante para o monitoramento da gestação, permite identificar em que momento da gestação há maior incidência de perdas (THIMONIER, 2000; TRALDI et al., 2007).

A avaliação da concentração de P₄ plasmática, nos dias 16 a 18 após o acasalamento ou inseminação artificial (IA), em ovinos é recomendada como um teste de prenhez precoce com alta sensibilidade (88-100%) (DE NICOLA et al., 2008; BARBATO et al., 2009). Entretanto, a especificidade do teste para ovelhas não-prenhes é variável (KAREN et al., 2003). A acurácia do diagnóstico positivo de prenhez (85,3%) é mais baixa que a acurácia do diagnóstico negativo (98,3%) (BOSCO et al., 2003). A comparação da concentração de P₄ na

hora do acasalamento com a concentração de P₄ no D18 pode aumentar a acurácia do diagnóstico de gestação (SUSMEL e PIASENTIER, 1992)

O uso de diferentes métodos de dosagens, enzimaímunoensaio (EIA), radioímunoensaio (RIE) e quimiluminescência, podem determinar a concentração de P₄ para o diagnóstico de prenhez (BOSCOS et al., 2003; ALEXANDER et al., 2008). Resultados em cabras mostram que a dosagem por radioímunoensaio de P₄, tanto no soro, como nas fezes, pode ser usada como um método de diagnóstico de prenhez (CAPEZZUTO et al., 2008).

Embora avaliação da concentração de P₄ no plasma seja usada para o diagnóstico precoce de prenhez em pequenos ruminantes, não há um consenso quanto à concentração de P₄ discriminatória entre animais prenhes ou não (BOSCOS et al., 2003). Karen et al. (2003) consideraram a concentração plasmática de P₄ ≥ 1 ng/mL, mensurada por radioímunoensaio (RIA), como concentração indicativa de tecido luteal ativo, e essa concentração, 18 dias após a IA, pode ser discriminatória entre ovelhas prenhes e não-prenhes, enquanto, Boscós et al. (2003), utilizando a dosagem de P₄ por enzimaímunoensaio (EIA), consideraram uma concentração de P₄ mais elevada ($\geq 2,5$ ng/mL) como sendo determinante da prenhez. Estas diferenças entre as concentrações de P₄ das ovelhas prenhes e entre os níveis discriminatórios podem ser atribuídas a diferenças na sensibilidade do ensaio utilizado, diferenças individuais, raças e manejo (BOSCOS et al., 2003).

É essencial que dados exatos do manejo reprodutivo (detecção de estros, data da cobertura ou IA) estejam disponíveis para uma interpretação correta dos resultados da dosagem de P₄ (DIONYSIUS, 1991; SUSMEL e PIASENTIER, 1992), sendo assim, uma baixa concentração de P₄ (< 1 ng/mL) indica que o animal não está prenhe. Uma alta concentração de P₄ apenas confirma a existência de tecido luteal ativo nos ovários que pode ser devido à prenhez ou por outras condições que podem prolongar a vida do corpo lúteo (hidrometra, mucometra, piometra e mumificação fetal). Esta é uma importante limitação da dosagem de P₄ para o diagnóstico de gestação precoce (BOSCOS et al., 2003; TRALDI et al., 2004; BARBATO et al., 2009).

2.6 – QUIMIOLUMINESCÊNCIA

Os métodos diretos de radioímunoensaio, para dosagem de hormônios esteroides no soro ou plasma de humanos, representaram um avanço importante na análise clínica de rotina,

sendo a técnica mais sensível e precisa utilizada (DE BOEVER et al., 1984). No entanto, envolve o uso de antígenos marcados com isótopos radioativos, o que gerou diversos problemas, incluindo (a) conservação e estabilidade dos componentes marcados radioativamente; (b) perigos para a saúde associados com o uso e a eliminação dos compostos radioativos e os solventes necessários para cintilação; e (c) o alto custo e manutenção de equipamentos (KIM et al., 1982; DE BOEVER et al., 1984; KOHEN et al., 1986; CIARLINI et al., 2002). A utilização de marcadores quimioluminescentes, como os derivados do isoluminol e os derivados do éster de acridio, foram sugeridos como alternativa para superar as desvantagens do radioimunoensaio, mantendo a especificidade, sensibilidade e precisão da reação antígeno anticorpo (KIM et al., 1982; RICHARDSON et al., 1985).

Como vantagens do uso dos marcadores quimioluminescentes comparado ao radioimunoensaio com I^{25} destacam-se: (a) não utiliza material radioativo, (b) possui prazos maiores de validade do que as metodologias tradicionais de radioimunoensaio; (c) é um método automatizado, em que não há manuseio de amostras e reagentes, evitando-se, assim, os tradicionais erros de pipetagem e trocas de reagentes; sendo possível também propiciar técnicas com resultados muito mais apurados do ponto de vista do coeficiente de variação intraensaio e diminuir o risco de acidentes com materiais biológicos ou reagentes, oferecendo maior segurança ao operador; (d) em virtude da alta performance de automação do aparelho, as transferências de líquidos e pipetagens são feitas de maneira precisa, com segurança para a execução dos testes em uniplicata; e (e) possibilita a execução de vários testes diferentes em uma mesma amostra de uma única vez, oferecendo maior rapidez para a obtenção dos resultados (IMMULITE, 1996; CIARLINI et al., 2002)

Kim et al. (1982) descreveram um imunoensaio por quimioluminescência de fase sólida para a mensuração de estradiol-17 β , no plasma de mulheres. O método tem sensibilidade ($1,5 \pm 0,2$ pg por amostra), especificidade, precisão (CV% intraensaio 9,4%, entre-ensaio 7,9%) e acurácia semelhantes a um radioimunoensaio, com uma alta correlação ($r= 0,97$). A quimioluminescência é iniciada pela oxidação do marcador, isoluminol. O rendimento de luz é inversamente proporcional à concentração de esteroide da amostra (KIM et al., 1982).

Não há dúvida de que a quimioluminescência já atingiu um estado comparável com a do RIA em termos de sensibilidade e de confiabilidade. Com o desenvolvimento de marcadores mais eficientes (por exemplo, derivados de acridio), sistemas mais simples de oxidação e técnicas imunoquimioluminométricas, a possibilidade de obtenção de sensibilidades maiores do que aquelas até agora alcançadas deve tornar-se uma realidade.

Além disso, a disponibilidade de instrumentos extremamente confiáveis relativamente baratos e simples irá facilitar a aceitabilidade da técnica de quimioluminescência em análise clínica (KIM et al., 1982).

Richardson et al. (1985) relataram um imunoensaio por quimioluminescência utilizando antígeno marcado com éster de acridio para mensurar a progesterona extraída do plasma de mulheres, obtendo-se uma boa correlação com o RIA ($r = 0,93$). A sensibilidade, ou seja, a quantidade mínima do hormônio possível de ser dosado na amostra foi de $0,64 \pm 0,2$ nmol/L. Para testar a acurácia da dosagem por quimioluminescência, amostras dosadas por RIA receberam quantias crescentes de progesterona e foram dosadas novamente com RIA e quimioluminescência. Os resultados tiveram uma variação de $-2,2\%$ a $-9,5\%$. Para estimar a variação intraensaio, dez amostras foram mensuradas em duplicata dentro de um único ensaio (CV% 7,2 a 12,5%). Para estimar a variação entre-ensaio, cinco ensaios foram feitos três vezes separadamente (CV% 12,4 a 23,3%) (RICHARDSON et al., 1985).

Amostras de plasma de mulheres não-gestantes em diferentes fases do ciclo menstrual foram extraídas com éster de petróleo, e os extratos tiveram a progesterona mensurada por RIA e por imunoensaio de quimioluminescência. Os resultados dos dois métodos obtiveram boa correlação ($r=0,97$) e a sensibilidade alcançada (25 pg/amostra) é comparável à obtida por meio do RIA, e é satisfatória para a mensuração de progesterona no plasma (KOHEN et al., 1979).

Até a década de 80, o desenvolvimento de um imunoensaio por quimioluminescência de esteroides gonadais no soro não extraído era considerado muito difícil, se não impossível, devido principalmente à convicção de que as substâncias no soro que interferem na mensuração da luminescência não podiam ser eliminadas de forma adequada, dando origem à quimioluminescência de fundo, variavelmente elevada, que limitava muito a sensibilidade e a acurácia. No entanto, a utilização de uma fração de IgG purificada de anticorpos policlonais antiprogesterona, covalentemente ligados a esferas de poliacrilamida, em um imunoensaio de quimioluminescência direto de fase sólida para a progesterona no soro, com a inclusão do Danazol como um agente de deslocamento para inibir a ligação da progesterona às proteínas do soro, alcançou resultados comparados com aqueles obtidos por RIA. Isso demonstra que a progesterona pode ser dosada diretamente do plasma com um método direto de quimioluminescência em fase sólida, que é preciso e sensível. O método direto de quimioluminescência apresentou uma sensibilidade de 0,54 nmol/L (DE BOEVER et al., 1984).

Já há algum tempo existem vários métodos analíticos que utilizam o princípio da quimioluminescência, porém, o método imunoenzimático amplificado é atualmente o mais utilizado na rotina laboratorial em humanos no Brasil; no exterior, comercialmente conhecido como Immulite[®] (DPC Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA) (CIARLINI et al., 2002). O método consiste em uma unidade teste com uma pérola revestida com anticorpo policlonal específico para o hormônio a ser dosado, na qual adiciona-se o soro do paciente e a fosfatase alcalina conjugada, para que ocorra a competição entre o esteroide e a enzima marcada, por um número limitado de sítios ligantes do anticorpo. A enzima conjugada não-ligada é removida por centrifugação para a parte coaxial da unidade teste. Por fim, adiciona-se o substrato quimioluminescente - éster fosfato de adamantil dioxetano e realiza-se a leitura no luminômetro (CIARLINI et al., 2002). Existe uma relação inversa entre a quantidade de progesterona presente na amostra de soro e a quantidade de unidades de luz relativas detectadas pelo sistema (LEE et al., 2010).

No comércio, estão disponíveis para a medicina humana mais de 300 kits de quimioluminescência úteis para o diagnóstico de processos alérgicos, neoplásicos e de doenças infecciosas, assim como, ensaios destinados à avaliação endócrina, à determinação de citocinas e ao monitoramento de drogas, dentre outros. Entretanto, para a medicina veterinária, há poucos kits de quimioluminescência disponíveis comercialmente. Semelhante ao que ocorre com a metodologia do RIA, alguns testes de quimioluminescência disponíveis comercialmente podem potencialmente ser utilizados na medicina veterinária. Para tal, há necessidade de se fazer mais estudos comparando os ensaios de quimioluminescência com outras metodologias disponíveis. Em virtude do potencial de seu uso na medicina veterinária, têm sido divulgados resultados iniciais que demonstram a eficiência do sistema Immulite[®] (CIARLINI et al., 2002).

Nos últimos anos, ocorreu um grande desenvolvimento das metodologias de ensaios analíticos baseadas no princípio da quimioluminescência, cuja eficiência tem sido comprovada (CIARLINI et al., 2002). Lee et al. (2010), descrevendo um método primário de mensuração de progesterona para certificação de materiais de referência, distribuíram amostras previamente dosadas para laboratórios de análises clínicas comerciais, que utilizam os métodos de quimioluminescência. Os resultados mostraram grande variação entre os laboratórios clínicos, por causa da baixa concentração de progesterona das amostras. Os resultados dos laboratórios clínicos não concordaram com a do método proposto, visto que, embora o método de quimioluminescência tenha uma sensibilidade analítica de 0,21 ng mL⁻¹, a variância entre laboratórios clínicos era grande. O valor de um laboratório era quase 16

vezes maior do que o de outro laboratório. Portanto, recomenda-se que a certificação dos valores atribuídos aos calibradores ou materiais de controle deve ser assegurada por meio de procedimentos disponíveis de mensuração de referência (LEE et al., 2010).

A aplicação desta metodologia em diferentes áreas da medicina humana e veterinária merece discussão, particularmente por ser um recurso analítico ecologicamente mais correto, não baseado em radioisótopos e, portanto, dentro dos preceitos modernos de biossegurança.(CIARLINI et al., 2002).

3 - OBJETIVOS

3.1 - OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil de progesterona plasmático determinado por um sistema automatizado de quimioluminescência (IMMULITE I, SIEMENS) após a sincronização do estro e ao longo da gestação, em ovelhas da raça Santa Inês.

3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar a dosagem de P₄ por quimioluminescência em ovinos da Raça Santa Inês.
- Determinar o perfil de progesterona plasmático ao longo da gestação.

1 **Avaliação do perfil de progesterona plasmático em ovinos por quimioluminescência**
2 **durante a gestação**

3
4 **Hugo Louvain da Silva Lima¹, Maria Clara Caldas-Bussiere², Ângelo José Burla**
5 **Dias², Márcia Rezende Faes³, Celia Raquel Quirino², Anneliese de Souza Traldi⁴**

6
7 ¹ Mestrando em Ciência Animal – UENF

8 ² Prof. Dr., Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal, CCTA, UENF

9 ³ Médica Veterinária, Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal, HV,
10 UENF

11 ⁴ Prof. Dr. – Departamento de Reprodução Animal, FMVZ, USP

12
13 **RESUMO** - Objetivou-se avaliar o perfil de progesterona plasmático, após a
14 sincronização do estro e ao longo da gestação, em dez ovelhas da raça Santa Inês, e a
15 possibilidade de diagnóstico precoce de gestação por um sistema automatizado de
16 quimioluminescência. As ovelhas tiveram o estro sincronizado e foram acasaladas por
17 monta natural controlada. As amostras de plasma para dosagem de P₄ foram colhidas após
18 a sincronização e durante a gestação. A dosagem da P₄ foi determinada por imunoensaio
19 competitivo que usa a quimioluminescência direta. Foi considerado D0 o dia da
20 manifestação do estro. O diagnóstico de gestação foi realizado no D25 por meio da
21 ultrassonografia transretal, classificando os animais em não-prenhes (NP, n = 4), e prenhes
22 (P, n = 6). A concentração plasmática de P₄ permaneceu baixa e sem diferença significativa
23 (p>0,05) do D0 ao D2 em ambos os grupos, NP e P. No D9, houve uma elevação nos dois
24 grupos (NP e P) (3,00 ± 1,13; 4,43 ± 0,47 ng/mL, respectivamente NP e P). Do D16 ao
25 D18, houve diferença significativa (p<0,05) entre NP e P D16 (NP 2,67 ± 1,25 ng/mL, e P
26 4,65 ± 0,82 ng/mL), D17 (NP 2,17 ± 1,44 ng/mL, e P 5,40 ± 2,49 ng/mL) e D18 (NP 2,17
27 ± 1,67 ng/mL, e P 4,80 ± 1,39 ng/mL). Os animais P permaneceram com a concentração
28 plasmática de P₄ elevada por toda a gestação. Do D9 (4,43 ± 0,47 ng/mL) ao D96 (4,70 ±
29 1,70 ng/mL), não houve grandes variações na concentração de P₄ em ambos os grupos. A
30 concentração plasmática de P₄ máxima foi no D132 (11,87 ± 4,31 ng/mL), diminuindo até
31 o parto (1,30 ± 0,28 ng/mL) e permanecendo basal após o parto. A técnica de
32 quimioluminescência é viável para avaliar o perfil de P₄ plasmático em ovinos.

33
34 **Palavras-chave:** progesterona plasmática, quimioluminescência, ovelhas, gestação.

35

36

37

Introdução

38

39

40 A mensuração da progesterona (P_4) plasmática em ovinos é um confiável indicador
41 da função do corpo lúteo, sendo, com isso, possível identificar e monitorar os diferentes
42 estádios fisiológicos da fêmea (Thimonier, 2000). A progesterona é um hormônio esteroide
43 especialmente importante na preparação do útero para a implantação do embrião e na
44 manutenção da gestação (Ren et al., 2008). A concentração de progesterona plasmática
45 determinada em ovelhas 18 dias após a inseminação artificial por enzimaímmunoensaio
46 (EIA) e radioímmunoensaio (RIA) demonstrou alta acurácia para o diagnóstico de gestação
47 (Susmel e Piasentier, 1992; Karen et al., 2003). Entretanto, a maioria dos estudos tem-se
48 limitado às primeiras semanas de gestação. O perfil plasmático de P_4 pode ser usado para
49 monitorar a gestação, pois as perdas embrionárias em ovelhas resultam da baixa
50 concentração de progesterona plasmática (Mukasa e Viviani, 1992; Ranilla et al., 1994).

51 Alguns métodos têm sido descritos para a mensuração da P_4 plasmática, tais como,
52 radioímmunoensaio e enzimaímmunoensaio (Karen et al., 2003; Boscós et al., 2003).
53 Entretanto, existem algumas desvantagens: o RIA tem problemas associados com o
54 marcador radioativo, como nocividade para o operador, além de baixa estabilidade do
55 marcador. Já o EIA não tem a mesma sensibilidade do RIA e pode não atender à exigência
56 de uma avaliação precisa de P_4 em baixa concentração (Ren et al., 2008).

57 A mensuração da P_4 plasmática por quimioluminescência é o método utilizado na
58 rotina laboratorial em mulheres para superar as desvantagens do RIA, mantendo a
59 especificidade e sensibilidade (Richardson et al., 1985). Na Medicina Veterinária,
60 semelhante ao que ocorre com a metodologia do RIA, potencialmente, alguns testes de
61 quimioluminescência disponíveis no comércio podem ser utilizados. Para tal, há

62 necessidade de se fazer mais estudos para validar a dosagem de progesterona plasmática
63 por quimioluminescência em animais (Ciarlini et al., 2002).

64 Objetivou-se validar a dosagem de progesterona plasmática em ovinos por
65 quimioluminescência e avaliar o perfil de progesterona plasmática, após a sincronização do
66 estro e ao longo da gestação em ovelhas da raça Santa Inês, com isso, possibilitando o
67 diagnóstico precoce de gestação por meio desta técnica de mensuração de progesterona
68 plasmática.

69

70

Material e Métodos

71

72 Foram utilizadas dez ovelhas da raça Santa Inês, hígdas, com idade entre 2 e 4 anos.
73 Os animais foram mantidos em fotoperíodo natural durante o verão. Durante o dia, os
74 animais permaneceram em piquetes de capim estrela (*Cynodon nlemfuensis* vr.
75 *Nlemfuensis*), com água e sal mineral *ad libitum*. Durante o período noturno, receberam
76 capim elefante (*Pennisetum purpureum*) picado no cocho, sem suplementação com
77 concentrado.

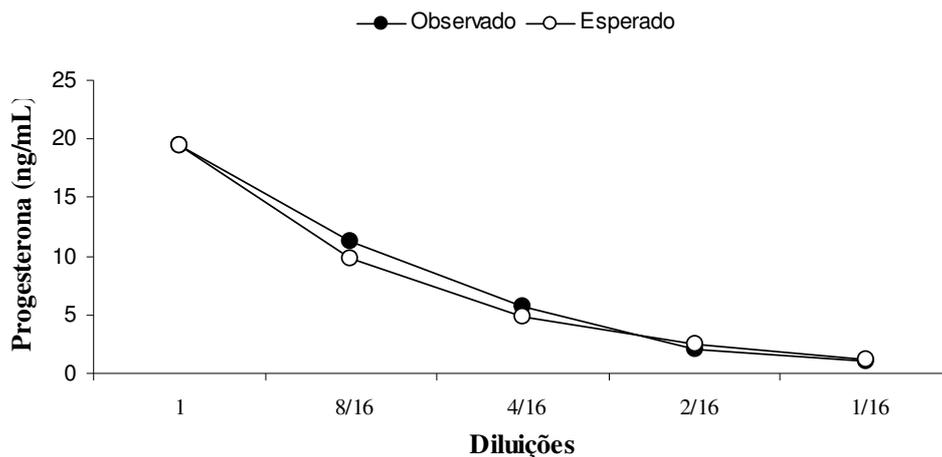
78 Todos os animais foram avaliados por ultrassonografia e apresentaram pelo menos
79 dois ciclos estrais normais antes do início do experimento. Os estros foram sincronizados
80 com um protocolo de 9 dias com pessários vaginais contendo 60 mg de acetato de
81 medroxiprogesterona (MAP) (Progespon, Intervet Schering, São Paulo- SP, Brasil),
82 introduzido em um dia aleatório do ciclo estral D0. Após 7 dias (D-7), foram aplicados 200
83 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG) (Novormon, Intervet Schering, São Paulo- SP,
84 Brasil), e 100 µg de cloprostenol (Ciosin, Intervet Schering, São Paulo- SP, Brasil). O
85 pessário vaginal foi retirado no 9º dia (D-9). As ovelhas foram separadas em dois lotes de

86 cinco animais cada e apresentadas duas vezes ao dia aos reprodutores para detecção dos
87 sinais de estro e acasalamentos, nas primeiras 72 horas após a retirada dos pessários.

88 As amostras de plasma sanguíneo para dosagem de P₄ foram colhidas nos dias D0
89 (D0 – dia da manifestação do estro), D1, D2, e D9. Do D15 ao D25, as colheitas foram
90 diárias, visando avaliar regressão do corpo lúteo nas ovelhas não-gestantes ou morte
91 embrionária tardia. Do D26 ao D148, o plasma foi colhido semanalmente. A partir do
92 D148, as amostras foram colhidas diariamente até dois dias após o parto. No D25, foi
93 realizado o diagnóstico de gestação por ultrassonografia transretal com transdutor de 8
94 Mhz (Pie Medical Falco 100, Nutricell, São Paulo, Brasil). O exame foi repetido
95 semanalmente até a 10^a semana de gestação. As ovelhas não-gestantes tiveram a
96 concentração plasmática de P₄ mensurada apenas até o D18.

97 Para a obtenção do plasma, o sangue foi colhido em tubo heparinizado e centrifugado
98 a 1700 x g durante 10 minutos, sob refrigeração (4°C), imediatamente após a colheita. O
99 plasma foi aliquotado em tubos individualizados, identificados e estocado a -20°C. Para as
100 dosagens de P₄, o plasma foi descongelado em temperatura ambiente e novamente
101 centrifugado a 1700 g durante 10 minutos, sem refrigeração.

102 A mensuração de P₄ foi determinada por um sistema automatizado de
103 quimioluminescência (Immulite I[®], Siemens Healthcare Diagnostics Ltd., Los Angeles,
104 CA, USA) utilizando um imunoensaio competitivo que se baseia na tecnologia de
105 quimioluminescência direta, com uma sensibilidade analítica de 0,2 ng/mL e uma precisão
106 intraensaio de 6,3 a 16%, e precisão interensaio de 5,8 a 16%. Para validar o ensaio de
107 quimioluminescência para progesterona plasmática em ovinos, foi realizada uma curva de
108 diluição seriada (16/16, 8/16, 4/16, 2/16, 1/16) para avaliar se havia deslocamento da
109 concentração de P₄, como apresentado na figura 1 (Fig. 1).



110

111 Fig. 1 – Deslocamento da concentração plasmática de P_4 de ovelhas da raça Santa Inês,
 112 mensurada por quimioluminescência, apresentando os resultados observados e
 113 esperados em diferentes diluições (16/16, 8/16, 4/16, 2/16, 1/16).

114

115 Os dados foram tabulados e posteriormente analisados pelo sistema SAS (Statistical
 116 Analysis System, 1996). Foram avaliadas a consistência dos dados e a estatística descritiva
 117 (PROC MEANS, PROC FREQ, PROC UNIVARIATE, SAS). Para realizar a análise de
 118 variância, os valores das dosagens foram transformados em logaritmos (\log_{10}), utilizando-
 119 se o teste Student Newman Keuls, com um nível de significância de 5%.

120

121

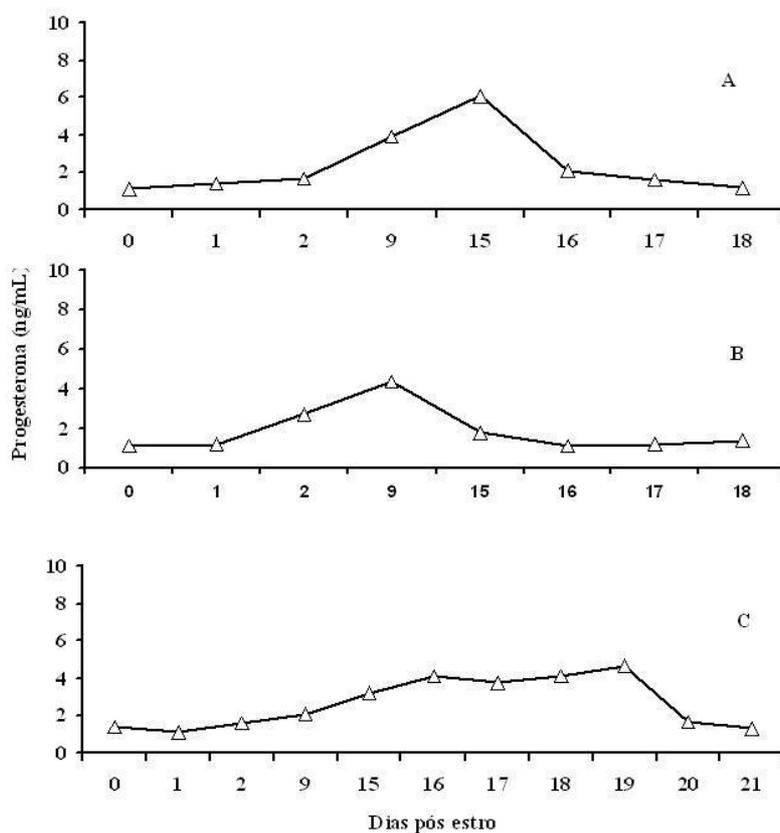
Resultados

122

123 Durante o período de rufiação e acasalamento, todos os animais ($n=10$) apresentaram
 124 sinais clínicos de estro no intervalo de 36 a 72 horas após a retirada do pessário vaginal,
 125 com uma maior concentração ($n=6$) entre 48 a 60 horas. A taxa de gestação detectada por
 126 ultrassonografia foi de 60% ($n=6$) e os animais classificados em não-prenhes (NP, $n = 4$) e
 127 prenhes (P, $n =6$). Uma das ovelhas NP apresentou um perfil de P_4 totalmente fora dos
 128 padrões esperados, sendo retirada do experimento. As concentrações plasmáticas de P_4

129 individual das ovelhas NP e P estão apresentadas na figura 2 (fig.2) e figura 3 (fig.3),
130 respectivamente.

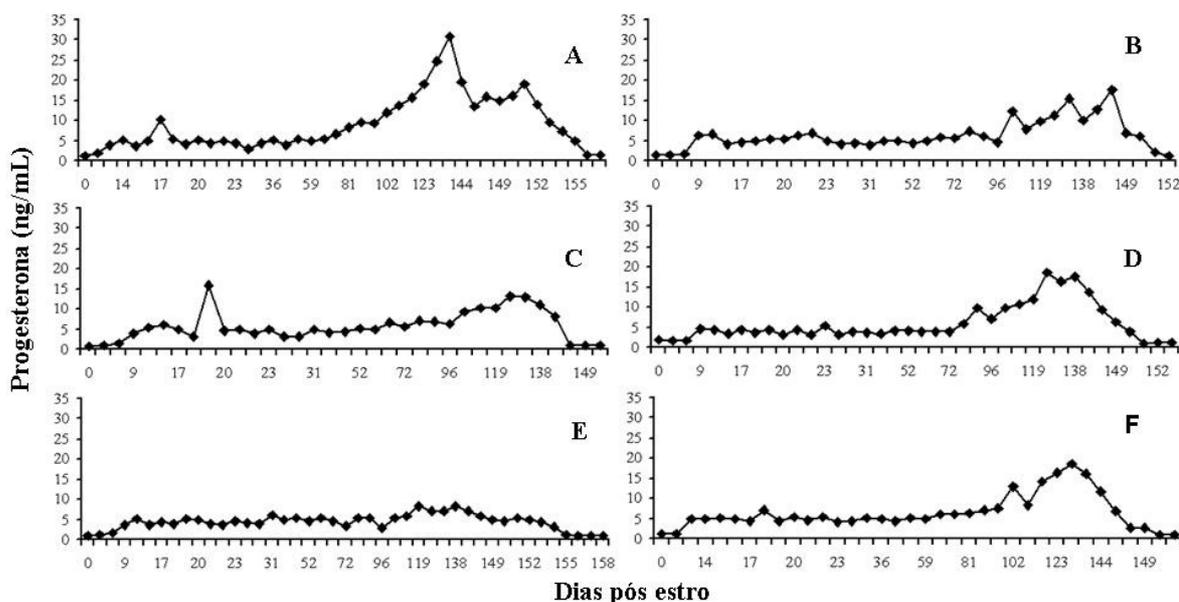
131



132

133 Fig. 2 – Concentração de progesterona plasmática individual dos animais
134 diagnosticados como não-prenhes (NP), mensurada por
135 quimioluminescência. (A) animal 1, (B) animal 2 e (C) animal 3.

136



137

138 Fig. 3 – Concentração de progesterona plasmática individual dos animais diagnosticados
 139 como prenhes (P), mensurada por quimioluminescência; (A) animal 4; (B) animal
 140 5; (C) animal 6; (D) animal 7; (E) animal 8; (F) animal 9.

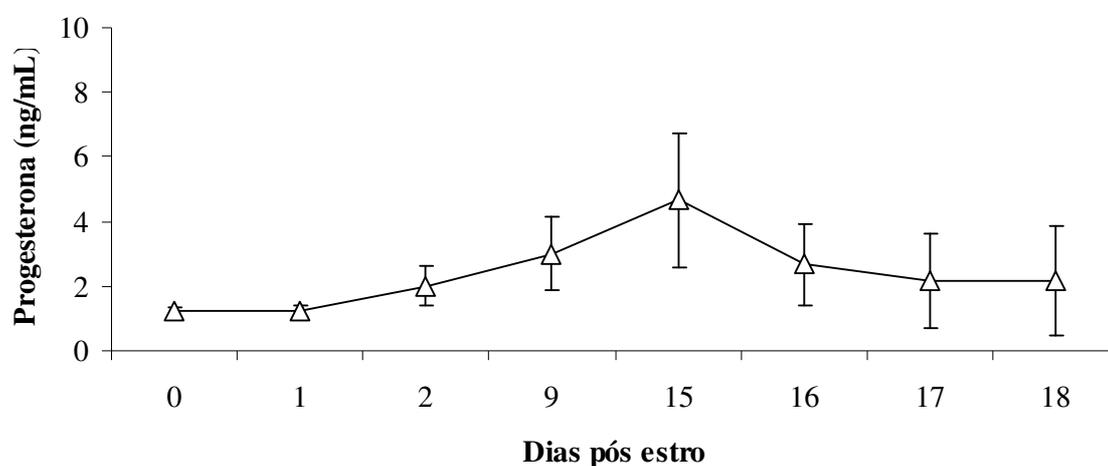
141

142 A concentração plasmática de P_4 permaneceu baixa e sem diferença significativa
 143 ($p > 0,05$) do D0 ao D2 em ambos NP e P: D0 $1,20 \pm 0,17$; $1,23 \pm 0,36$ ng/mL, D1 $1,23 \pm$
 144 $0,15$; $1,45 \pm 0,34$ ng/mL e D2 $2,00 \pm 0,61$; $1,60 \pm 0,10$, respectivamente, período em que os
 145 animais manifestaram estro. A elevação de P_4 evidenciada nos dois grupos (NP e P) no D9
 146 sinalizou ovulação em todos os animais experimentais ($3,00 \pm 1,13$; $4,43 \pm 0,47$ ng/mL,
 147 respectivamente NP e P).

148

149 Nas ovelhas NP, houve uma significativa diminuição da concentração plasmática de
 150 P_4 do D16 ao D18, gerando uma diferença significativa ($P < 0,05$) entre as ovelhas NP e P
 151 nos D16 (NP $2,67 \pm 1,25$ ng/mL, e P $4,65 \pm 0,82$ ng/mL), D17 (NP $2,17 \pm 1,44$ ng/mL, e P
 151 $5,40 \pm 2,49$ ng/mL) e D18 (NP $2,17 \pm 1,67$ ng/mL, e P $4,80 \pm 1,39$ ng/mL) (Fig. 4).

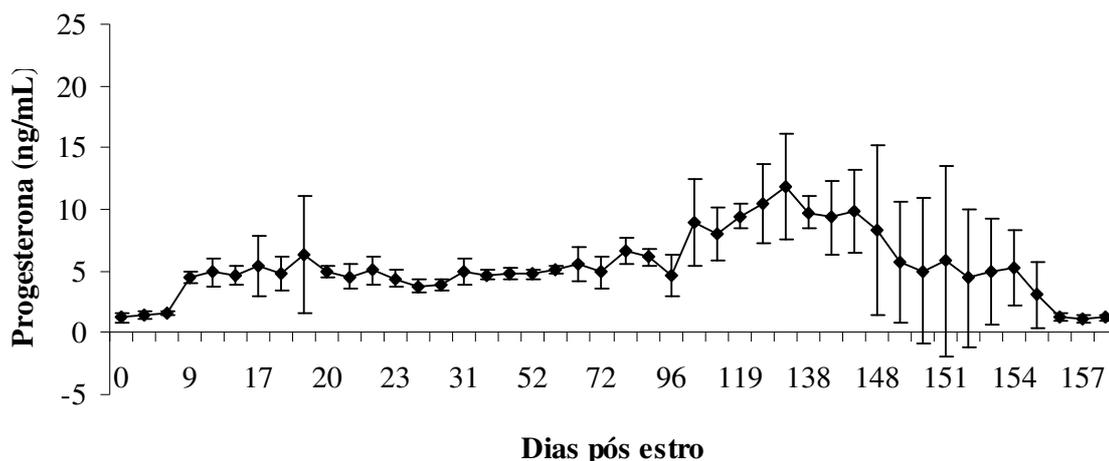
152 As ovelhas P permaneceram com a concentração plasmática de P₄ elevada por toda a
153 gestação, como apresentada na figura 5 (fig. 5). Nos animais do grupo P, não houve
154 diferença marcante na concentração de P₄ do D9 (4,43 ± 0,47 ng/mL) ao D96 (4,70 ± 1,70
155 ng/mL). A partir do D96, ocorreu um aumento gradativo da concentração plasmática de P₄,
156 possivelmente de origem placentária, alcançando concentrações máximas no D132 (11,87
157 ± 4,31 ng/mL), decaindo gradativamente até o parto (1,30 ± 0,28 ng/mL) e permanecendo
158 com concentração basal semelhante à alcançada no estro até a última dosagem, 2 dias após
159 o parto. A gestação teve uma duração média de 152 ± 3 dias.



160

161 Fig. 4 – Média da concentração de progesterona plasmática das ovelhas não-prenhes (NP),
162 após a sincronização do estro, mensurada por quimioluminescência.

163



164

165 Fig. 5 – Média da concentração de progesterona plasmática mensurada por
 166 quimioluminescência das ovelhas prenhes (P), durante a gestação.

167

168

169

170

Discussão

171

172 Apesar de a sensibilidade analítica do método utilizado ser de 0,2 ng/mL, todas as
 173 ovelhas experimentais apresentaram concentração de P₄ plasmática maior que 1,0 ng/mL
 174 tanto no momento do estro quanto no pós parto, sendo considerada a concentração $\leq 2,00$
 175 ng/mL como basal, valor superior ao relatado por Mukasa e Viviani (1992) (<1 ng/mL),
 176 utilizando enzimaímunoensaio, e Ranilla et al. (1994) e Karen et al. (2003), com
 177 radioímunoensaio. Segundo Boscós et al. (2003), essa diferença pode ser atribuída à
 178 sensibilidade dos métodos e a variáveis na padronização laboratorial.

179 Entre D0 e D2, momento da manifestação do estro, a concentração plasmática de P₄
 180 foi considerada basal. Tal resultado foi semelhante ao descrito por Braun et al. (1988),
 181 Karen et al. (2003) e Alexander et al. (2008), que avaliaram o perfil plasmático de P₄ em
 182 ovinos utilizando enzimaímunoensaio, radioímunoensaio e quimioluminescência,
 183 respectivamente.

184 O aumento da concentração de P_4 do D0 ao D9, tanto nas ovelhas NP como nas P,
185 indicou a ovulação e a formação do corpo lúteo com atividade secretora de P_4 . Não houve
186 diferença significativa na concentração plasmática de P_4 durante a fase do diestro (D9)
187 entre as ovelhas prenhes e não-prenhes, semelhante ao relatado por deNicolo et al. (2009)
188 em ovelhas cíclicas

189 As ovelhas diagnosticadas como NP pela ultrassonografia apresentaram um declínio
190 na concentração de P_4 do D16 ao D18, indicando luteólise, conforme relatado, para ovelhas
191 com ciclos estrais normais, por Cunningham et al. (1975); Karsch et al. (1980); Pineda,
192 (2003). A diferença significativa entre a concentração de P_4 das ovelhas diagnosticadas NP
193 e P no D18 está em concordância com os resultados de Boscos et al. (2003); Karen et al.
194 (2003); deNicolo et al. (2008) e Barbato et al. (2009), os quais utilizaram
195 enzimaimunoensaio (EIA) e radioimunoensaio (RIA) para dosagem da P_4 plasmática de
196 ovinos. A mensuração da P_4 no D18, após o início do estro ou IA da ovelha, é recomendada
197 como um método de diagnóstico de gestação precoce com alta sensibilidade (88-100%)
198 (Barbato et al., 2009). Entretanto, a especificidade do teste para a não-prenhez é variável
199 (60-100%; Karen et al., 2003).

200 Existem algumas limitações da mensuração da concentração de P_4 como método de
201 diagnóstico de gestação precoce. São necessários dados precisos do manejo reprodutivo
202 dos animais (detecção de cio, data de acasalamento ou IA), para a interpretação correta dos
203 resultados (Dionysius, 1991; Susmel e Piasentier, 1992). Uma alta concentração de P_4
204 plasmática no D18 após a IA, para ser um resultado positivo para gestação, deve ser
205 diferenciada de outras condições que prolonguem a vida do CL, como pseudogestação
206 hidrometra, mucometra, piometra, e mumificação fetal (Boscos et al., 2003; Traldi et al.,
207 2004; Barbato et al., 2009). Contudo, a avaliação da concentração de P_4 no dia da IA e 18
208 dias após pode reduzir o número de falsos positivos, já que os animais que apresentarem

209 concentração alta de P₄ no dia da IA não estariam realmente no estro (Susmel e Piasentier,
210 1992; Karen et al., 2003).

211 A análise de perfis de progesterona nos permite avaliar se ocorreu ovulação, perda
212 embrionária e luteólise prematura, como também indica a função lútea, na medida em que
213 a concentração plasmática é um reflexo da atividade luteínica (deNicolo et al., 2009).

214 A concentração de P₄ plasmática das ovelhas P permaneceu elevada ao longo de toda
215 a gestação, alcançando concentração máxima no D132. Após, teve início uma diminuição
216 gradativa, acentuando-se nos últimos dias de gestação e, alcançando, no parto, uma
217 concentração próxima àquelas do estro semelhante ao relatado na mesma espécie por
218 Mukasa e Viviani (1992), Ranilla et al. (1994), Boscos et al. (2003), Alexander et al.
219 (2008) e Ganaie et al. (2009).

220 Em geral, a concentração média de P₄ plasmática em ovelhas prenhes não sofre
221 alteração significativa até o terço final da gestação, quando a placenta atinge sua máxima
222 atividade esteroidogênica na produção de P₄. Segundo Ranilla et al.(1997) e Karen et
223 al.(2006), essa alta concentração de P₄ no terço final da gestação pode estar relacionada
224 com o número de fetos e o peso ao nascimento do cordeiro.

225 O perfil da concentração de P₄ plasmática mensurada por quimioluminescência
226 durante a gestação foi semelhante ao relatado por Mukasa e Viviani (1992) e Ranilla et al.
227 (1994) utilizando métodos com enzimaensaio e radioensaio, respectivamente.
228 Tais métodos são os mais utilizados para a dosagem de P₄ em medicina veterinária, o que
229 permite sugerir que o método de dosagem por quimioluminescência pode ser utilizado para
230 a dosagem de progesterona em ovinos. Em adição, a dosagem de P₄ por
231 quimioluminescência não necessita de duplicata, não requer o uso de marcadores
232 radioativos e é realizada por um sistema totalmente automatizado, diminuindo assim os
233 erros relacionados à pipetagem, além de ser um método tão preciso quanto o de

234 radioimunoensaio (Kim et al., 1982; Richardson et al., 1985; Immulite, 1996; Ciarlino et
235 al., 2002).

236

Conclusão

237

238 A técnica de quimioluminescência é um método confiável para mensurar a
239 concentração de progesterona plasmática no ciclo estral e gestação de ovinos.

240

241

Referências

242

243 ALEXANDER, B.; COPPOLA, G.; MASTROMONACO, G.F. et al. Early pregnancy
244 diagnosis by serum progesterone and ultrasound in sheep carrying somatic cell nuclear
245 transfer-derived pregnancies. **Reproduction of Domestic Animals**, v.43, p.207–21,
246 2008.

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

250 BORJESSON, D.L.; BOYCE, W.M.; GARDNER, I.A.; et al. Pregnancy detection in
251 bighorn sheep (*ovis canadensis*) using a fecal-based enzyme immunoassay. **Journal**
252 **Wildlife Diseases**, v.32, p.67-74. 1996.

253 BOSCOS, C.M.; SAMARTZ, F.C.; LYMBEROPOULOS, A.G. et al. Assessment of
254 progesterone concentration using enzymeimmunoassay, for early pregnancy diagnosis
255 in sheep and goats. **Reproduction of Domestic Animals**, v.38, p.170–17, 2003.

256 BRAUN, W.F.; SOLORZANO, N.M.; BIERSCHWAL, C.J. Characterization of the caprine
257 estrous cycle using enzyme immunoassay for the determination of whole blood
258 progesterone assay. **Theriogenology**, v.29, p.1155–1162. 1988.

259 BUTTLE, H.L. The maintenance of pregnancy in hypophysectomized goats. **Journal of**
260 **Reproduction and Fertility**, v.52, p.255-260. 1978.

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

263 CUNNINGHAM, N.F.; SYMONS, A.M.; SABA, N. Levels of progesterone, LH and FSH
264 in the plasma of sheep during the oestrous cycle. **Journal of Reproduction and**
265 **Fertility**, v.45, p.177–180, 1975.

266 deNICOLO, G.; PARKINSON, T.J.; KENYON P.R. et al. Plasma progesterone
267 concentrations during early pregnancy in spring- and autumn-bred ewes. **Animal**
268 **Reproduction Science**, v.111, p.279–288, 2009.

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

271 GANAIEA, B.A.; KHANA, M.Z.; ISLAMA, R. et al. Evaluation of different techniques
272 for pregnancy diagnosis in sheep. **Small Ruminant Research**, v.85, p.135–141, 2009.

273 IMMULITE: veterinary methods comparisons. Los Angeles: DPC, p.25. 1996.

274 KAREN, A.; AMIRI, B.; BECKERS, J.F. et al. Comparison of accuracy of
275 transabdominal ultrasonography, progesterone and pregnancy-associated glycoproteins

- 276 tests for discrimination between single and multiple pregnancy in sheep.
277 **Theriogenology**, v.66, p.314–322. 2006.
- 278 KAREN, A.; BECKERS, J.F.; SULON, J. et al. Early pregnancy diagnosis in sheep by
279 progesterone and pregnancy- associated glycoprotein tests. **Theriogenology**, v.59,
280 p.1941-1948. 2003.
- 281 KARSCH, F.J.; LEGAN, S.J.; RYAN, K.D. et al. Importance of estradiol and progesterone
282 in regulating LH secretion and estrous behavior during the sheep estrous cycle. **Journal**
283 **of Reproduction and Fertility**, v.23, p.404–413. 1980.
- 284 KIM, J.B.; BARNARD, G.J.; COLLINS, W.P. et al. Measurement of plasma estradiol- 17 β
285 by solid-phase chemiluminescence immunoassay. **Clinical Chemistry**, v.28, n.5,
286 p.1120-1124. 1982.
- 287 MUKASA-MUGERWA, E.; VIVIANI, P. Progesterone concentrations in peripheral
288 plasma of Menz sheep during gestation and parturition. **Small Ruminant Research**,
289 v.8, p.47-53. 1992.
- 290 NODEN, D.N.; DE LAHUNTA, A. The Embryology of domestic animals. developmental
291 mechanisms and malformation. Williams & Wilkins, Baltimore/London, p.43–69, 1985.
- 292 PINEDA, M.H. Reproductive patterns in sheep and goats. In: Pineda, M.H. (Ed.),
293 **McDonald's Veterinary Endocrinology and Reproduction**. Iowa State Press,
294 Blackwell Publishing Company, p.435–458. 2003.
- 295 RANILLA, M.J.; SULON, J.; CARRO, M.D.; et al. Plasmatic profiles of pregnancy–
296 associated glycoprotein and progesterone levels during gestation in Churra and Merino
297 sheep. **Theriogenology**, v.42, p.537–545. 1994.
- 298 RANILLA, M.J.; SULON, J.; MANTECON, A.R. et al. Plasma pregnancy-associated
299 glycoprotein and progesterone concentrations in pregnant Assaf ewes carrying single
300 and twin lambs. **Small Ruminant Research**, v.24, p.125-131. 1997.
- 301 REN, S.; WANG, X.; LIN, Z. et al. Development of a high-throughput, indirect antibody
302 immobilization format chemiluminescence enzyme immunoassay (CLEIA) for the
303 determination of progesterone in human serum. **Luminescence**, v.23, p.175–181. 2008.
- 304 RICHARDSON, A.P.; KIM, J.B.; BARNARD, G.J. et al. Chemiluminescence
305 immunoassay of plasma progesterone, with progesterone-acridinium ester used as the
306 labeled antigen. **Clinical Chemistry**, v.31, n.10. 1985.
- 307 SUSMEL P, PIASANTIER E. Assessment of pregnancy in Bergamasca ewes by analysis of
308 plasma progesterone. **Small Ruminant Research**, v.8, p.325–332, 1992.
- 309 THIMONIER, J. Détermination de l'état physiologique des femelles par analyse des
310 niveaux de progestérone. **Inra Production Animal**, v.13, n.3, p.177-183. 2000.
- 311 TRALDI, A.S.; GONÇALVES, P.B.D. ; ELOY, A.M.X. et al. Diagnóstico precoce de
312 gestação através de dosagens hormonais e proteica. In: SANTOS, M.H.B.; OLIVEIRA,
313 M.A.L.; LIMA, P.F. (Org.). Diagnóstico de gestação na cabra e na ovelha. 1 ed. Varela,
314 São Paulo, v.01, p.47-58. 2004.
- 315 TRALDI, A.S.; MIRANDA, M.S.; TAROUCOU, A.K. et al. Gestação de clones ovinos
316 obtidos por transferência nuclear de célula somática em oócitos homólogos e
317 heterólogos.. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões,
318 Costa do Sauipe. Acta Scientiae Veterinariae. Porto Alegre: Universidade Federal do
319 RGS, 2007. v.35, p.1275-1275. 2004. (Resumo)
- 320 ZARKAWI, M.; SOUKOUTI, A. Serum progesterone levels using radioimmunoassay
321 during oestrous cycle of indigenous Damascus does. **New Zealand Journal of**
322 **Agricultural Research**, v.44, p.165-169. 2001.
- 323
- 324

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, B.; COPPOLA, G.; MASTROMONACO, G.F. et al. Early pregnancy diagnosis by serum progesterone and ultrasound in sheep carrying somatic cell nuclear transfer-derived pregnancies. **Reproduction of Domestic Animals**, v.43, p.207–21, 2008.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SANTA INÊS – ABSI. A raça.<
<http://www.absantaines.com.br/>>. Acessado em 05/12/2011.
- BABY, T.E; BARTLEWSKI P.M. Circulating concentrations of ovarian steroids and follicle-stimulating hormone (FSH) in ewes with 3 or 4 waves of antral follicle emergence per estrous cycle. **Reproductive Biology**, v.11, n.1. 2011.
- BAIRD, D.T; BAKER, T.G; McNATTY, K.P. et al. Relationship between the secretion of the corpus luteum and the length of the follicular phase of the ovarian cycle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 45, p.611-619. 1975.
- BARBATO, O.; SOUSA, 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.
- BARRELL, G.K.; MOENTER, S.M.; CAHATY, A. et al. Seasonal changes of gonadotropin-releasing hormone secretion in the ewe. **Biology of Reproduction**, v.46, p.1130-1135. 1992.
- BARTLEWSKI, P.M.; BEARD, A.P.; CHAPMAN, C.L. et al. Ovarian responses in GnRH-treated anoestrous ewes: follicular and endocrine correlates with luteal outcome. **Reproduction, Fertility and Development**, v.13, p.133–142. 2001.
- BARTLEWSKI, P.M.; BEARD, A.P.; COOK, S.J.; et al. Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.115, p.111- 124. 1999.
- BARTLEWSKI, P.M.; BEARD, A.P.; RAWLINGS, N.C. Ultrasonographic study of ovarian function during early pregnancy and after parturition in the ewe. **Theriogenology**, v.53, p.673- 689. 2000.
- BORJESSON, D.L.; BOYCE, W.M.; GARDNER, I.A.; et al. Pregnancy detection in bighorn sheep (*ovis canadensis*) using a fecal-based enzyme immunoassay. **Journal Wildlife Diseases**, v.32, p.67-74. 1996.

- BOSCOS, C.M.; SAMARTZ, F.C.; LYMBEROPOULOS, A.G. et al. Assessment of progesterone concentration using enzymeimmunoassay, for early pregnancy diagnosis in sheep and goats. **Reproduction of Domestic Animals**, v.38, p.170–17, 2003.
- BRAUN, W.F.; SOLORZANO, N.M.; BIERSchWAL, C.J. Characterization of the caprine estrous cycle using enzyme immunoassay for the determination of whole blood progesterone assay. **Theriogenology**, v.29, p.1155–1162. 1988.
- BUTTLE, H.L. The maintenance of pregnancy in hypophysectomized goats. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.52, p.255-260. 1978.
- CAPEZZUTO, A.; CHELINI, M.O.M.; FELIPPE, E.C.G. et al. Correlation between serum and fecal concentrations of reproductive steroids throughout gestation in goats. **Animal Reproduction Science**, v.103, p.78–86. 2008.
- CHEMINEAU, P.; GAUTHIER, D.; POIRIER, J.C. et al. Plasma levels of LH, FSH, prolactin, oestradiol-17 β and progesterone during natural and induced oestrus in the dairy goat. **Theriogenology**, v.17, n.3, p.313-323. 1982.
- CIARLINI, L.R.P.; CIARLIN, P.C.; FEITOSA, F.L.F. Quimiluminescência: princípio e aplicações. **Revista Educação Continuada CRMV-SP**, v.5, n.2, p.181-187. 2002.
- COELHO, L.A.; RODRIGUES, P.A.; NONAKA, K.O. et al. Annual pattern of plasma melatonin and progesterone concentrations in hair and wool ewe lambs kept under natural photoperiod at lower latitudes in the southern hemisphere. *Journal of Pineal Research*. v.41, p.101–107. 2006.
- CUNNINGHAM, N.F.; SYMONS, A.M.; SABA, N. Levels of progesterone, LH and FSH in the plasma of sheep during the oestrous cycle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.45, p.177–180, 1975.
- DE BOEVER, J.; KOHEN, F.; VANDEKERCKHOVE, D. et al. Solid-phase chemiluminescence immunoassay for progesterone in unextracted serum. **Clinical Chemistry**, v.30, n.10, p.637-1641. 1984.
- deNICOLO, G.; PARKINSON, T.J.; KENYON P.R. et al. Plasma progesterone concentrations during early pregnancy in spring- and autumn-bred ewes. **Animal Reproduction Science**, v.111, p.279–288, 2009.
- DIONYSIUS D.A. Pregnancy diagnosis in dairy goats and cows using progesterone assay kits. **Australian Veterinary Journal**, v.68, p.14–16, 1991.
- DUGGAVATHI, R.; BARTLEWSKI, P.M.; BARRETT, D.M.W. et al. Patterns of antral follicular wave dynamics and accompanying endocrine changes in cyclic and seasonally

- anestrous ewes treated with exogenous ovine follicle-stimulating hormone during the inter-wave interval. **Biology and Reproduction**, v.70, p.821–827. 2004.
- FONSECA, J.F. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, 2005, Goiânia, GO. **Anais: Palestras**, p.1-9. 2005.
- FONSECA, J.F.; BRUSCHI, J.H. Reprodução Assistida em Pequenos Ruminantes. **Revista de Ciências Agrárias**, v.43. 2005. (Suplemento).
- GANAI EA, B.A.; KHANA, M.Z.; ISLAMA, R. et al. Evaluation of different techniques for pregnancy diagnosis in sheep. **Small Ruminant Research**, v.85, p.135–141, 2009.
- IMMULITE: veterinary methods comparisons. Los Angeles: DPC, p. 25. 1996.
- KAREN, A.; AMIRI, B.; BECKERS, J.F. et al. Comparison of accuracy of transabdominal ultrasonography, progesterone and pregnancy-associated glycoproteins tests for discrimination between single and multiple pregnancy in sheep. **Theriogenology**, v.66, p.314–322. 2006.
- KAREN, A.; BECKERS, J.F.; SULON, J. et al. Early pregnancy diagnosis in sheep by progesterone and pregnancy-associated glycoprotein tests. **Theriogenology**, v.59, p.1941-1948. 2003.
- KARSCH, F.J.; LEGAN, S.J.; RYAN, K.D. et al. Importance of estradiol and progesterone in regulating LH secretion and estrous behavior during the sheep estrous cycle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.23, p.404–413. 1980.
- KHANUM, S.A.; HUSSAIN, M.; KAUSAR, R. Progesterone and estradiol profiles during estrous cycle and gestation in dwarf goats (*capra hircus*). **Pakistan Veterinary Journal**, v.28, n.1, p.1-4. 2008.
- KILLIAN, D.B.; KIESLING, D.O.; WARREN, J.E. Lifespan of corpora lutea induced in estrous-synchronized cycling and anestrous ewes. **Journal of Animal Science**, v.61. 1985.
- KIM, J.B.; BARNARD, G.J.; COLLINS, W.P. et al. Measurement of plasma estradiol-17 β by solid-phase chemiluminescence immunoassay. **Clinical Chemistry**, v.28, n.5, p.1120-1124. 1982.
- KOHEN, F.; DE BOEVER, J.; KIM, J.B. Surface chemiluminescent immunoassays of steroids. **Methods Enzymol.**, v.133, p.387-391. 1986.
- KOHEN, F.; PAZZAGLI, M.; KIM, J.B. et al. An assay procedure for plasma progesterone based on antibody-enhanced chemiluminescence. **Febs Letters**, v.104, n.1, p.201-205. 1979.
- LEE, H.; PARK, C.J.; LEE, G. Measurement of progesterone in human serum by isotope dilution liquid chromatography–tandem mass spectrometry and comparison with the

- commercial chemiluminescence immunoassay. **Anal Bioanal Chem**, v.396, p.1713–1719. 2010.
- MENCHACA, A.; VILARINO, M.; CRISPO, M. et al. New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v.22, p.113-118. 2010.
- MUKASA-MUGERWA, E.; VIVIANI, P. Progesterone concentrations in peripheral plasma of Menz sheep during gestation and parturition. **Small Ruminant Research**, v.8, p.47-53. 1992.
- NEVES, J.P.; OLIVEIRA, J.F.C.; FREITAS, V.J.F. et al. Diagnóstico de prenhez em ruminantes. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. (Eds). **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2 ed. Roca, Ltda, São Paulo, p.17-32. 2008.
- NODEN, D.N.; DE LAHUNTA, A. The Embryology of domestic animals. developmental mechanisms and malformation. Williams & Wilkins, Baltimore/London, p.43–69, 1985.
- OYEDIPE, E.O.; VOH, A.A.; MARIRE, B.N. et al. Plasma progesterone concentrations during the oestrous cycle and following fertile and non-fertile inseminations of zebu heifers. **British Veterinary Journal**, v.142, p.41-46. 1986.
- PINEDA, M.H. Reproductive patterns in sheep and goats. In: Pineda, M.H. (Ed.), **McDonald's Veterinary Endocrinology and Reproduction**. Iowa State Press, Blackwell Publishing Company, p.435–458. 2003.
- RANILLA, M.J.; SULON, J.; CARRO, M.D.; et al. Plasmatic profiles of pregnancy-associated glycoprotein and progesterone levels during gestation in Churra and Merino sheep. **Theriogenology**, v.42, p.537–545. 1994.
- RANILLA, M.J.; SULON, J.; MANTECON, A.R. et al. Plasma pregnancy-associated glycoprotein and progesterone concentrations in pregnant Assaf ewes carrying single and twin lambs. **Small Ruminant Research**, v.24, p.125-131. 1997.
- REN, S.; WANG, X.; LIN, Z. et al. Development of a high-throughput, indirect antibody immobilization format chemiluminescence enzyme immunoassay (CLEIA) for the determination of progesterone in human serum. **Luminescence**, v.23, p.175–181. 2008.
- RICHARDSON, A.P.; KIM, J.B.; BARNARD, G.J. et al. Chemiluminescence immunoassay of plasma progesterone, with progesterone-acridinium ester used as the labeled antigen. **Clinical Chemistry**, v.31, n.10. 1985.
- ROSA, H.J.D.; BRYANT, M.J. Seasonality of reproduction in sheep. **Small Ruminant Research**, v.48, p.155–171. 2003.

- SALLES, M.G.F.; ARAÚJO A.A. Corpo lúteo cíclico e gestacional: revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, n.3, p.185-194. 2010.
- SANTOS, R. **A cabra e a ovelha no Brasil**. Uberaba: Agropecuária Tropical, 479p. 2003.
- SANTOS, R. SANTA INÊS: **A RAÇA FUNDAMENTAL**. Uberaba: Agropecuária Tropical, 568p. 2007.
- SEEKALLU, S.V.; BARRETT, D.M.W.; TOOSI, B.M. et al. Pulsatile LH secretion and ovarian follicular wave emergence and growth in anestrus ewes. **Theriogenology**, v.74, p.912–921. 2010.
- SEEKALLU, S.V.; TOOSI B.M.; RAWLINGS N.C. LH pulse frequency and the emergence and growth of ovarian antral follicular waves in the ewe during the luteal phase of the estrous cycle. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.7, n.78. 2009.
- SEEKALLU, S.V.; TOOSI, B.M.; DUGGAVATHI, R. et al. Ovarian antral follicular dynamics in sheep revisited: Comparison among estrous cycles with three or four follicular waves. **Theriogenology**, v.73, p.670–680. 2010.
- SEEKALLU, S.V.; TOOSI, B.M.; ZEIGLER, A. et al. Effects of estradiol and progesterone on circulating LH and FSH secretion, and ovarian antral follicle growth in anestrus ewes. **Small Ruminant Research**, v.91, p.178–185. 2010.
- SIMPLÍCIO, A.A.; SANTOS, D.O. Estação de monta vs mercado de cordeiro e leite. In: Simpósio de Caprinos e Ovinos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, 1, Anais. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG. 2005.
- SIMPLÍCIO, A.A.; FREITAS, V.J.F.; FONSECA, J.F. Biotécnicas da reprodução como técnicas de manejo reprodutivo em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.234-246. 2007.
- SOUZA, C.J.H.; CAMPBELL, B.K.; BAIRD, D.T. Follicular Dynamics and Ovarian Steroid Secretion in Sheep during the Follicular and Early Luteal Phases of the Estrous Cycle. **Biology of Reproduction**, v.56, p.483-488. 1997
- SOUSA, N.M.; GARBAYO, J.M.; FIGUEIREDO, J.R. et al. Pregnancy-associated glycoprotein and progesterone profiles during pregnancy and postpartum in native goats from the north-east of Brazil. **Small Ruminant Research**, v.32, p.137-147. 1999.
- SPENCER, T.E.; JOHNSON, G.A.; BAZER, F.W. et al. Implantation mechanisms: insights from the sheep. **Society for Reproduction and Fertility**, p.1470–1626. 2004.
- SPENCER, T.E.; JOHNSON, G.A.; BAZER, F.W.; et al. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and

- endogenous retroviruses. **Reproduction, Fertility and Development**, v.19, p.65-78. 2007.
- SUSMEL P, PIASENTIER E. Assessment of pregnancy in Bergamasca ewes by analysis of plasma progesterone. **Small Ruminant Research**, v.8, p.325–332, 1992.
- THIMONIER, J. Détermination de l'état physiologique des femelles par analyse des niveaux de progestérone. **Inra Production Animal**, v.13, n.3, p.177-183. 2000.
- TRALDI, A.S.; GONÇALVES, P.B.D.; ELOY, A.M.X. et al. Diagnóstico precoce de gestação através de dosagens hormonais e proteica. In: SANTOS, M.H.B.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F. (Org.). Diagnóstico de gestação na cabra e na ovelha. 1 ed. Varela, São Paulo, v.01, p.47-58. 2004.
- TRALDI, A.S.; MIRANDA, M.S.; TAROUCOU, A.K. et al. Gestação de clones ovinos obtidos por transferência nuclear de célula somática em oócitos homólogos e heterólogos.. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Costa do Sauipe. Acta Scientiae Veterinariae. Porto Alegre: Universidade Federal do RGS, 2007. v.35, p.1275-1275. 2004. (Resumo)
- VERÍSSIMO, C.J.; TITTO, C.G.; KATIKI, L.M. et al. Tolerância ao calor em ovelhas Santa Inês de pelagem clara e escura. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.10, n.1, p.159-167. 2009.
- WU, D.; BARRETT, D.M.W.; RAWLINGS, N.C. et al. Relationships of changes in ultrasonographic image attributes to ovulatory and steroidogenic capacity of large antral follicles in sheep. **Animal Reproduction Science**, 116, 73-84. 2009.
- ZARKAWI, M.; SOUKOUTI, A. Serum progesterone levels using radioimmunoassay during oestrous cycle of indigenous Damascus does. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v.44, p.165-169. 2001.