












Perfis da progesterona sérica durante o ciclo estral de vacas de leite e de corte determinados pela Imunoquimioluminescência (CLIA) validados pela Imunoabsorção Enzimática (ELISA)

Serum progesterone profiles during the estrous cycle of dairy and beef cows determined using immunochemiluminescence (CLIA) and validated using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Isabela da Silveira Padilha¹ , Luiz Ernandes Kozicki¹ , Marina de Pauli Thomaz¹ , Carlos Alberto Mayora Aita¹ , Saulo Henrique Weber¹ , Marcio Saponski Segui¹ , Fernando Andrade Souza² , Tacia Gomes Bergstein-Galan³ , José Carlos dos Santos Breda⁴ 

1 Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, Paraná, Brazil

2 Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná, Brazil

3 Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), Ponta Grossa, Paraná, Brazil

4 Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brazil

*Autor correspondente: ipadilha61@gmail.com

Resumo: O objetivo do estudo foi validar a metodologia da imunoquimioluminescência (CLIA) através da imunoabsorção enzimática (ELISA), determinando a concentração sérica de progesterona em vacas de leite e de corte, durante o ciclo estral. Foram empregadas 30 vacas multíparas não-prenhes (12 da raça Holandesa Preta e Branca e 18 Nelore). Vacas com corpo luteo foram escolhidas com vistas à sincronização do estro e da ovulação, mediante aplicação de 500 mcg de cloprostenol (im). Após a aplicação do luteolítico, os animais foram diariamente submetidos a exames de ultrassonografia (US) ovariana para verificação da ovulação (=dia 01 do ciclo), bem como eram colhidas 02 amostras de sangue para a determinação da P4 pela CLIA e ELISA. As amostras eram centrifugadas para a obtenção do soro, e congeladas a -20 graus para posterior dosagem. Os valores de ELISA e CLIA foram comparados entre si mediante teste t pareado, regressão, ANOVA e coeficiente de determinação (R²), visando a verificação da sensibilidade e correspondência linear. A concentração de P4 originou perfis similares entre as duas metodologias; os perfis de P4 foram mais elevados em bovinos de corte, que nos de leite. A correspondência entre as metodologias resultou em elevado quociente de R² nos perfis de P4. Concluiu-se que a CLIA pode ser empregada nas determinações hormonais da P4 sérica bovina; a CLIA mostrou elevada correspondência linear com os valores da ELISA; a CLIA pode auxiliar as biotecnologias da reprodução nas determinações hormonais.

Palavras-chaves: Dosagem hormonal; Reprodução Bovina; Hormônio reprodutivo; Vaca Nelore; Vaca Holandesa;

Abstract: This study aimed to validate the methodology of immunochemiluminescence (CLIA) using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to determine serum progesterone (P4) concentrations

Recebido: 10 de agosto, 2023. Aceito: 14 de junho, 2024. Publicado: 18 de junho, 2024.

in non-pregnant multiparous dairy (12 Holstein cows) and beef (18 Nelore cows) cows during the estrous cycle. Cows with corpus luteum were chosen for estrus and ovulation synchronization by administering 500 mcg of cloprostenol. After luteolytic application, the animals were subjected to ovarian ultrasonography (US) daily to verify ovulation (day zero of the cycle) and two blood samples were collected for P4 determination using CLIA and ELISA. Samples were centrifuged to obtain serum and frozen at -20 °C for later measurement. ELISA and CLIA values were compared using the paired t-test, regression, analysis of variance, and coefficient of determination (R^2) to verify sensitivity and linear correspondence. The P4 concentration determined by both methodologies showed a similar profile; the P4 profiles were higher in beef cattle than in dairy cattle. The correspondence between the methodologies resulted in a high quotient for R^2 the P4 profiles. It was concluded that CLIA can be used for hormonal determinations of bovine serum P4. CLIA showed a high linear correspondence with ELISA values and can thus aid reproductive biotechnologies for hormone determination.

Keywords: Hormone dosage; Bovine Reproduction; Reproductive hormone; Nelore cow; Holstein cow.

1. Introdução

Os crescentes desafios relacionados à produção e à reprodução de bovinos tem sido elencados como fatores limitantes para uma substancial expansão das biotécnicas da reprodução. Os estudos que objetivam proporcionar maior eficiência reprodutiva, frequentemente tem se deparado com o aprofundamento das pesquisas, com destaque à inseminação artificial em tempo fixo (IATF), à transferência de embrião em tempo fixo (TETF) e à Fertilização in vitro (FIV), dentre outras. Para entender os desafios da baixa eficiência reprodutiva da IATF por exemplo, há que se conhecer os perfis hormonais da P4 dos animais submetidos aos protocolos⁽¹⁾. Técnicas de determinações hormonais empregando-se o radiominaensaio (RIA) foram muito bem aceitas no passado recente. Mas, devido aos resíduos radioativos originados por esta técnica, encontra-se em progressivo processo de redução de uso, devido ao lixo radiotativo gerado. Para minimizar essa limitação houve o desenvolvimento simultâneo dos testes da imunoabsorção enzimática (ELISA)⁽²⁾ e o enzimmunoensaio (EIA)⁽³⁾, os quais utilizam ensaios enzimáticos para a determinação hormonal. O ELISA tem-se mostrado uma metodologia promissora para determinações de vários parâmetros, sendo frequentemente utilizada, principalmente para as determinações da progesterona sérica de bovinos⁽¹⁾.

Outra metodologia para determinações de vários parâmetros séricos (hormônios ou não-hormônios) vem sendo utilizada como alternativa ao RIA e ao ELISA, e que tem demonstrado boa correlação com o RIA, de sensível detecção, menor tempo de execução, menor custo e ínfimos efeitos ou resíduos indesejáveis dos seus reagentes^(4,5,6,7) denominada de imunoquimioluminescência (chemiluminescence assay; CLIA). A CLIA é amplamente empregada nas dosagens de perfis sanguíneos de vários hormônios na medicina humana, incluindo-se a progesterona. A CLIA tem demonstrado várias vantagens para sua adoção por conta da metodologia poder executar milhares de determinações por dia, uma vez que tem um avançado fluxo de automação, tornando o processo das determinações com menor custo, e sem a interferência humana (v.g. pipetagem automática dos reagentes, homogeneização dos reagentes, reações... cálculos...etc...). A metodologia da CLIA fundamenta-se no princípio

de emissão de luz, acarretando uma reação química⁽⁸⁾, gerando uma energia luminosa. Ela apresenta elevada sensibilidade, menor tempo de execução das análises, reduzido custo, além de ausência de efeitos tóxicos^(4,5). Além destes aspectos, as determinações hormonais por quimioluminescência, não necessitam de duplicatas de amostras e não requerem o uso de marcadores radioativos^(6,7,9).

Dentre os hormônios que participam do ciclo estral dos animais, a P4 é um hormônio fundamental para a regulação do funcionamento do sistema reprodutor da fêmea. O crescimento e o metabolismo folicular ovariano, e a sucessão das ondas de desenvolvimento (dinâmica folicular) são muito influenciados pela concentração circulante de P4⁽¹⁰⁾. A determinação da concentração de P4 tem sido utilizada para monitorar a capacidade funcional do corpo lúteo^(11,12), para o diagnóstico precoce da gestação^(11,13) e para análise de distúrbios endócrinos em fêmeas bovinas⁽¹⁴⁾. A mensuração de progesterona no soro ou plasma de vacas é de vital importância na pesquisa e nas observações clínicas dos aspectos reprodutivos.

Cardoso⁽¹⁵⁾, utilizou a imunoquimioluminescência como método analítico para avaliar as concentrações séricas de P4 (18 a 45 dias) em novilhas holandesas cíclicas e estabeleceu ligações com as funções reprodutivas, relatando correlação positiva entre o diâmetro do CL e a concentração de P4 ($r^2=0,22$ $P<0,0001$). Os resultados obtidos com a quimioluminescência foram condizentes com os do RIA e de ELISA e foram capazes de determinar a ocorrência de ciclos estrais, assim como de avaliar a funcionalidade ovariana.

O presente estudo teve como objetivo validar CLIA como metodologia alternativa ao RIA e ELISA como método auxiliar na determinação dos parâmetros relacionados ao P4 para técnicas de reprodução animal. Neste contexto, o presente trabalho investigou a eficiência do CLIA na obtenção de concentrações séricas de P4 em vacas leiteiras e de corte durante o ciclo estral fisiológico e validou a metodologia utilizando ELISA.

2. Materiais e métodos

O presente estudo foi aprovado na Comissão de Ética no Uso de Animais, pelo parecer nº 01686/2019.

O estudo foi conduzido em vacas múltiparas não lactantes e não-prenhes, em duas propriedades situadas nas coordenadas Latitude: 25°39'27"S; Longitude:49°18'29"W; n=12), e Latitude: 26°10'13"S; Longitude:53°21'41"W. As vacas leiteiras (raça Holandesa preta e Branca; n=12) foram submetidas ao sistema de manejo *free-stall*, com alimentação à base de ração (Leitemax 18 AE, Agraria Nutrição, Guarapuava, PR, Brasil), silagem de milho (*Zea mays*), feno (*Avena sativa*) e sal mineral (BellNutri 90, Bellman, São Paulo, Brasil) e água ad libitum. As vacas de corte (Nelore; n=18) permaneciam em pasto rotacionado com forrageiras (*Brachiaria decumbens*), sal mineral (Maxicorte 17, Agraria Nutrição, Guarapuava, PR, Brasil) nos cochos e água ad libitum. Todos os animais eram vacinados contra as principais doenças que acometem bovinos. Ao exame ginecológico prévios ao início do estudo (palpação transretal e exames de ultrassonografia) os animais estavam livres de distúrbios reprodutivos como cistos ovarianos (folicular ou luteínico) e para-ovarianos, aderências dos ovários, endometrites.

Critérios de seleção dos animais

Foram selecionados animais ciclando (presença de corpo lúteo, firmado por exames de ultrassonografia) e fora do período do puerpério tardio⁽¹⁶⁾. As medidas do FD foram executadas medindo-se o diâmetro longitudinal + o diâmetro diagonal e dividido por 2⁽¹⁷⁾.

Foi considerado ovulação quando se verificou ausência do folículo medido no dia anterior, associado ao conteúdo de média ecogenicidade na fossa de ovulação. Foi considerado CL quando verificado conteúdo em tom de cinza no lugar do outrora FD, que tinha aspecto anecoico. Foi considerado Atresia do FD da 1ª. onda folicular quando o folículo do dia anterior tinha sofrido redução nas suas dimensões (mm).

Indução ao estro, ultrassonografia e obtenção dos dados

Para a indução ao estro os animais foram submetidos a aplicação de 500 mcg de D-cloprostenol (im) (Ciosin, Zoetis, São Paulo). Vinte e quatro horas após a aplicação do luteolítico, foram executados exames de ultrassonografia, visando o acompanhamento do folículo dominante (FD). Foi considerado o dia zero (d0) do ciclo estral ao se detectar a ovulação do FD assim como foi considerado um ciclo estral completo, quando os animais retornaram a nova manifestação do estro visível (detecção visível dos sinais de estro durante o dia), com a presença de um folículo pré-ovulatório. Após a verificação da ovulação, os ovários eram escaneados diariamente (período vespertino) com aparelho de ultrassom (Mindway, transdutor 5.0, China) e os achados ovarianos anotados em fichas específicas, acompanhando-se as alterações das gônadas ao longo do intervalo entre as duas ovulações.

Coletas de sangue e determinações da P4

As coletas de sangue tiveram início no dia da ovulação (dia 0) e foram realizadas diariamente. As amostras eram coletadas em tubos Vacutainer®, por punção da *Vena caudalis*, e acondicionadas em geladeira. Finalizados os trabalhos de campo do dia, o sangue era centrifugado e o soro armazenado em tubos eppendorf, identificados com o número do animal, o dia da coleta da amostra e armazenadas em freezer (-20°C). As determinações da P4 pela ELISA e pela CLIA foram executadas todas no mesmo dia, após finalização dos trabalhos de campo.

Determinações hormonais

Os níveis séricos de P4 foram determinados pelo enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; Kit; placas com 96 poços; Bio Medix diagnostica, São Paulo- Brazil) e por imunoluminescência usando kit comercial para a CLIA (kit Access Progesterone; Beckman Coulter – USA). A sensibilidade do kit (CLIA) para a P4, tem uma variação de 0,10 a 40,0 ng/mL. Informações do fabricante, esclarecem que amostras de soro contendo até 5 mg/dL de bilirrubina, até 500 mg/dL de hemoglobina e até 450 mg/dL de triglicéridios, não causam interferência no teste. A variação intraensaio é menor que 10.0% aceitando-se os valores absolutos, baseado nos procedimentos de dosagens de rotina em Laboratório para determinação da P4 (Curitiba, Paraná, Brasil).

Para as mensurações da P4 (CLIA), as amostras eram colocadas em uma máquina com processamento automático para as determinações. As determinações da P4 foram executadas em equipamento Beckman Unicel Dxl 800. O teste Access Progesterone é um imunoenensaio competitivo quimioluminescente com partículas paramagnéticas para a detecção quantitativa dos níveis de P4 no soro humano, utilizando os sistemas de Imunoensaio Access, no. Cat 33550 para 100 determinações (Beckman Coulter, INC, CA, USA).

Critérios para a determinação da fase folicular e fase luteal do ciclo estral

A fase folicular consiste no proestro (formação do folículo dominante => pré ovulatório) + sinais externos do estro (comportamento e receptividade sexual, edema de vulva, etc) e a fase luteal consiste na formação e presença do CL + luteólise⁽¹⁸⁾. As fases do proestro e estro são marcados por baixa concentração circulante de progesterona, enquanto as fases luteais, metaestro e diestro, são marcados por aumento gradual e altas concentrações de p4 no perfil sérico dos animais.

Análise estatística

Os resultados dos achados ovarianos foram calculados utilizando a média e o desvio padrão. As concentrações séricas de progesterona foram determinadas pelas metodologias ELISA (ng/mL) e CLIA (ng/mL) em vacas de leite e de corte e apresentadas sob a forma de gráficos obedecendo a concentração da P4 no dia referido do ciclo estral. As concentrações séricas de P4 de cada unidade amostral (vaca) determinadas por meio de ELISA e CLIA foram comparadas pelo teste t pareado. A relação entre as concentrações séricas de progesterona mensuradas por meio de CLIA entre as vacas de leite e de corte foi analisada por meio de regressão linear, utilizando modelo linear, pelo método de mínimos quadrados (MMQ), cuja aderência aos dados originais foi testada pela ANOVA e pelo valor de R-quadrado, com o objetivo de estimar a concentração sérica real (obtida pelo CLIA) por meio da mensuração utilizando-se ELISA. Para todas as análises foram considerados significativos valores de $p < 0.05$.

3. Resultados

A tabela 1 mostra os dados da dinâmica folicular ovariana por ultrassonografia após administração de PGF1 alfa para indução do estro.

Tabela 1 Dimensões do folículo dominante (FD), atresia do FD (1ª. onda folicular), presença do Corpo lúteo (CL) pós ovulação, maior dimensão do CL e dimensão do folículo pré-ovulatório (2ª. onda folicular) em vaca Holandesa preta e branca (HPB) e em Nelore, acompanhadas por exames de ultrassonografia.

Grupo de vacas	Dimensão do FD da 1ª. onda folicular pós ovulação (mm) (x ± s)	Atresia do FD da 1ª. onda folicular (dia do ciclo) (x ± s)	Presença do CL pós aplicação da PGF2α (dia do ciclo) (x ± s)	Dimensão do FPO da 2ª. onda folicular (mm) (x ± s)
Nelore	8.9 ± 1.0	15.0 ± 1.7	4.0 ± 0.5	11.5 ± 1.4
Holandesa	11.41 ± 2.2	14.6 ± 1.1	3.0 ± 0.5	15.0 ± 1.5

Os perfis da P4 durante o ciclo estral das vacas Bos taurus e Bos indicus estão contemplados nas Figuras 1, 3 e 5. Os valores de P4 correspondem a cada dia do ciclo estral acompanhado, determinados pelas metodologias ELISA e CLIA. Observou-se harmonia nas curvas de P4 entre as duas metodologias com a particularidade de que na metodologia ELISA os valores mostraram-se superiores aos de CLIA. Isso pode ser verificado em todos os gráficos. Os gráficos possibilitaram a percepção de que há uma correspondência linear entre os valores obtidos nas vacas de leite e nas de corte, verificada pelo elevado valor de R², que variou de 0.947 a 0.964 sendo altamente significativo (p < 0.00001) (Tabela 2). A CLIA contemplou menores concentrações de P4 que nas mesmas amostras determinadas pelo ELISA.

Tabela 2 Relação entre o CLIA e o ELISA em vacas Holandesa e Nelore, executados os testes de regressão linear e método dos quadrados mínimos.

Valores da equação	Vaca Holandesa	Vacas Nelore	Vaca Holandesa e Nelore
a	0.6393	0.787	0.577
R ²	0.9864	0.9473	0.9643

Legenda: a: coeficiente do modelo ELISA= a * CLIA, em que Elisa e CLIA são as concentrações séricas de P4; R²: coeficiente de determinação múltipla; P: valor de p da ANOVA.

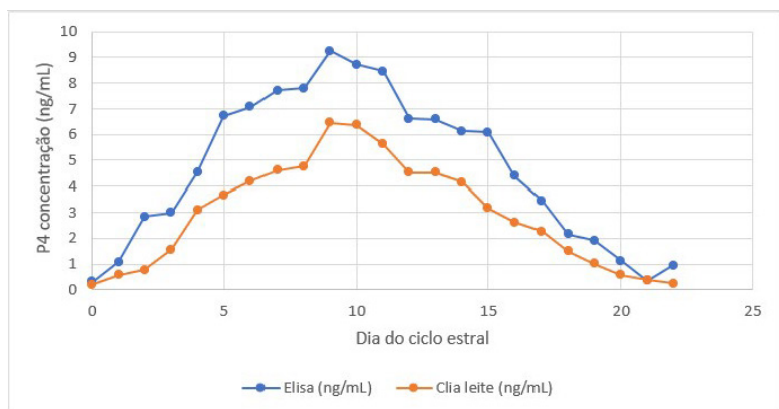


Figura 1 Perfis de progesterona sérica (ng/mL) em vaca Holandesa, mediante emprego da CLIA e ELISA, durante um ciclo estral.

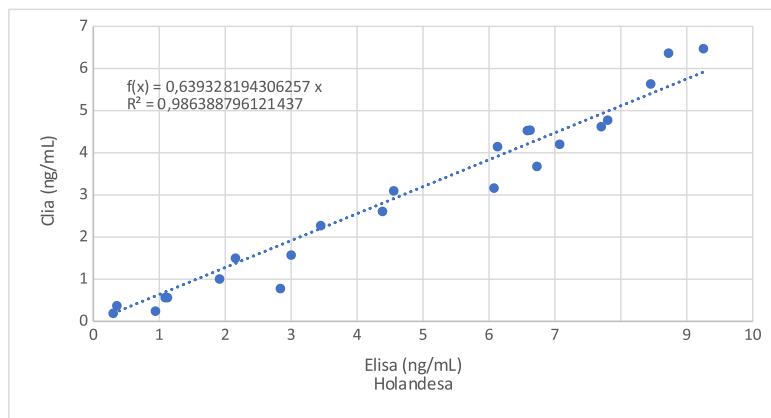


Figura 2 Determinações de progesterona sérica pelas metodologias CLIA e ELISA durante um ciclo estral em vacas Holandesas.

Nos gráficos 2, 4 e 6 observa-se uma correspondência linear entre os valores obtidos pelos dois métodos, verificada pelo elevado valor de R². Nos gráficos visualiza-se que o teste de ELISA superestima a concentração. O valor real pode ser obtido (conforme seria obtido pelo CLIA) aplicando-se a equação (Clia = 0,6393 * ELISA). Nos gráficos é possível observar que o ajuste foi significativo e que o coeficiente contribuiu significativamente para a equação.

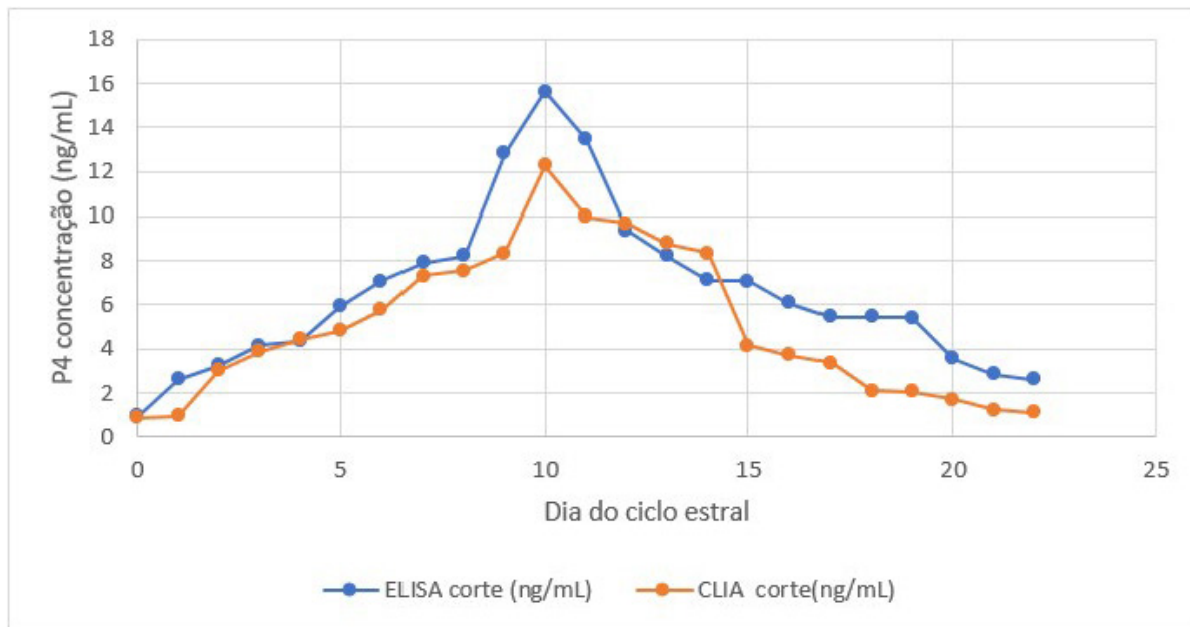


Figura 3 Perfis de progesterona (ng/mL) em vacas de corte (Nelore) mediante emprego da CLIA e ELISA, durante um ciclo estral.

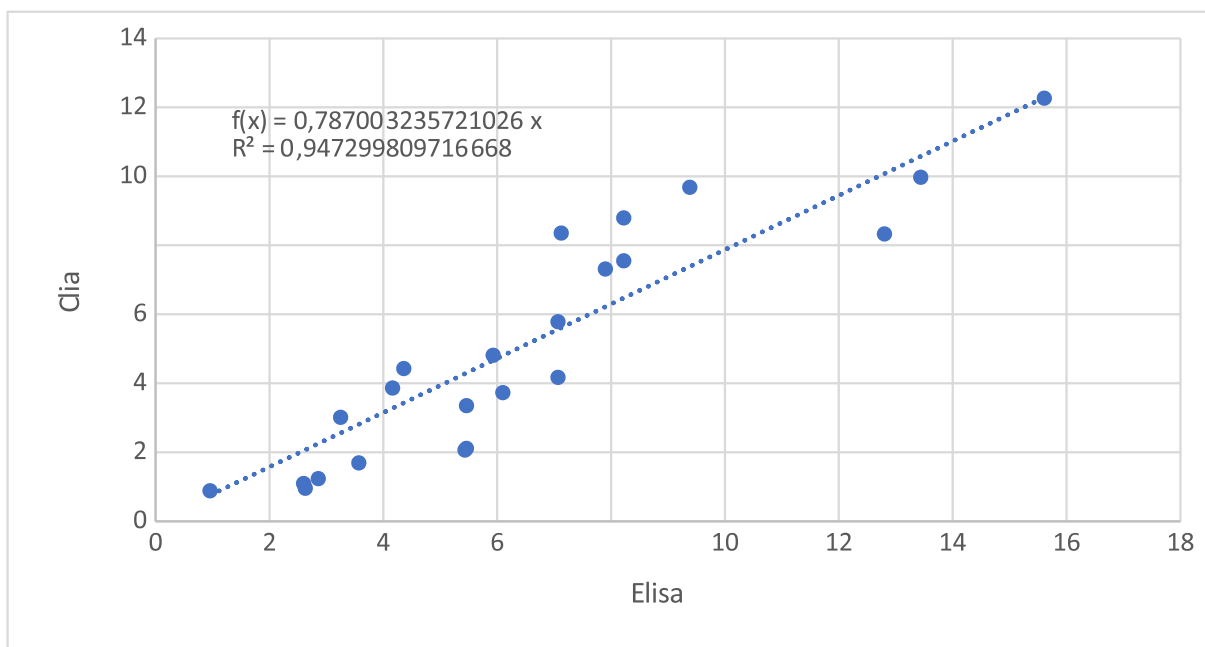


Figura 4 Determinações de progesterona sérica pelas metodologias CLIA e ELISA durante um ciclo estral em vacas Nelore.

Pode-se obter o valor real (conforme seria obtido pelo CLIA) aplicando-se a equação (CLIA = 0,787 * ELISA).

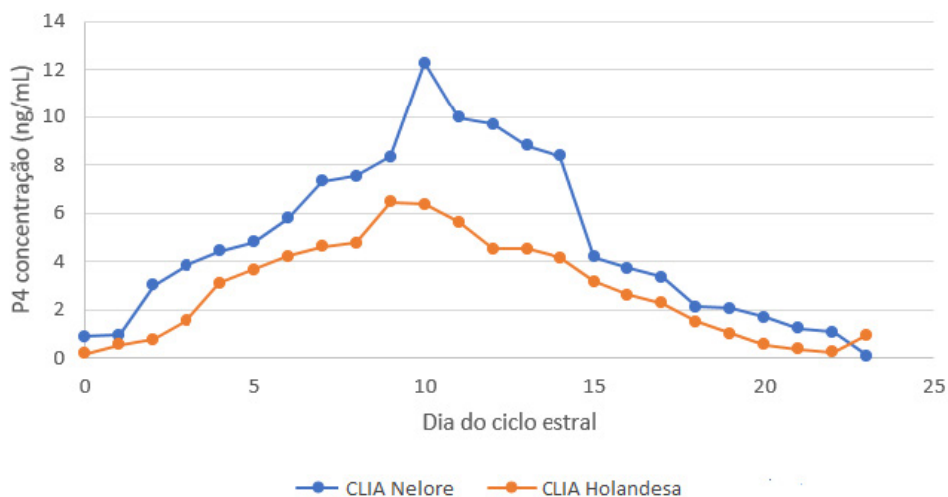


Figura 5 Perfis de progesterona (ng/mL) mediante emprego da CLIA durante um ciclo estral em vaca Holandesa e Nelore.

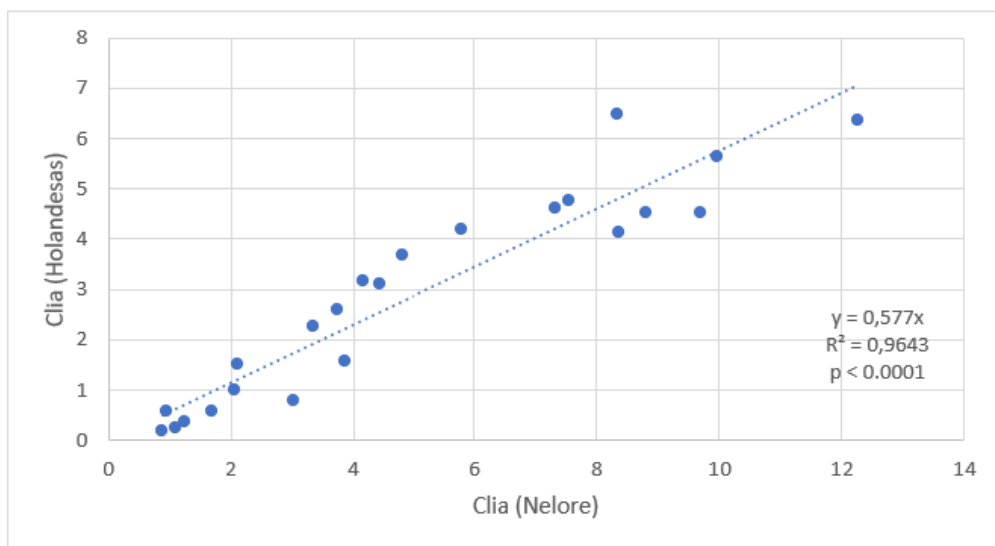


Figura 6 Determinações de progesterona sérica pela metodologia CLIA durante um ciclo estral em vacas Holandesas e Nelore.

Pode-se observar a relação existente entre o CLIA em vacas de leite e de corte é (CLIA = 0,577 * ELISA).

4. Discussão

No presente estudo, ações de acompanhamento da dinâmica folicular ovariana mediante exames de ultrassonografia, após a administração da PGF2α para indução ao estro, foram desenvolvidas. Observou-se o CL no 3º e 4º. dia após a ovulação respectivamente nas vacas HPB e Nelore (Tabela 1) corroborando relatos de Borges et al. (19). Após a ovulação e de acordo com a evolução da materialização do corpo hemorrágico, aconteceu a formação gradativa do CL (fase de metaestro precoce, médio e tardio) até sua formação, demandando 3 a 4 dias,

compatíveis com os teores de P4 séricos determinados. A concentração de P4 logo após a ovulação (dia 0) manteve-se em nível baixo, aumentando gradativamente a medida em que ocorria a reorganização tecidual na cratera de ovulação progredindo até a formação completa. No início do diestro, a concentração de P4 gradativamente elevou-se mantendo elevada por 11-14 dias em ambas as metodologias empregadas.

No presente estudo foi considerado validar a metodologia CLIA com o ELISA em bovinos de leite e de corte. Como observado nos gráficos houve correspondência linear entre os valores auferidos verificados pelo R^2 de elevado valor (Tabela 2, Figuras 2, 4 e 6), como já haviam demonstrado Prus et al.⁽⁷⁾, ao trabalharem com éguas cruzadas em uma estação reprodutiva. Os perfis sanguíneos de P4 nas vacas pesquisadas, evidenciam consonância com os achados obtidos nos exames de ultrassonografia executados, conforme os verificados por Kozicki et al.⁽⁶⁾, ao executarem estudos em vacas Jersey. Neste processo de validação da metodologia CLIA (pelo ELISA) verificou-se que os valores da concentração da P4 na CLIA, para os mesmos dias dos exames, foram mais elevados no ELISA (Figuras 1,3,5). Houve harmonia das curvas dos perfis das vacas (HPB e Nelore) apresentados por ambas as metodologias, corroborando relatos de Prus et al.⁽⁷⁾ trabalhando com éguas. Observou-se igualmente que os perfis oriundos da CLIA nas vacas leiteiras, evidenciaram menores quantidades de P4 durante o ciclo estral, quando comparadas com as vacas de corte. A relação entre o CLIA em bovinos de leite e de corte resultou em $0.577 \times$ ELISA. Isso pode ser justificado em função de que as vacas de leite detêm um metabolismo corporal mais intenso que as vacas de corte, resultando provavelmente nestas diferenças⁽²⁰⁾. A relação entre CLIA e ELISA mostrou-se significativa, sendo possível estimar com elevado valor de credibilidade de que a concentração de P4 obtida pelo CLIA é similar à de ELISA. Os 02 valores de $p < 0.0001$ referentes a ANOVA e a regressão linear indicou que esse coeficiente pode explicar a variação de CLIA a partir dos valores de ELISA.

Analisando-se ambas as metodologias, pode-se verificar que as fases de metaestro (crescente aumento da P4 em 1, 2, 3 e 4 pós ovulação) foram compatíveis entre si. Do mesmo modo, verificou-se que as metodologias acompanharam harmonicamente a fase de diestro, de modo a se observar elevação dos perfis de P4 para valores >6 (ELISA) e >3 (CLIA) no dia 5 do ciclo estral, compatíveis com os relatos de Kozicki et al.⁽⁶⁾.

Borges et al.⁽¹⁹⁾, avaliaram a dinâmica folicular, a regressão luteal e as concentrações de P4 em vacas das raças Gir e Nelore. O diâmetro do folículo ovulatório foi de $11,0 \pm 0,9$ mm, e o corpo lúteo foi detectado pela primeira vez por volta do dia $2,6 \pm 0,7$ após a ovulação, resultado este compatível com o verificado no presente estudo. No final do ciclo estral, a redução nas concentrações de P4 não foi acompanhada pela proporcional diminuição na área do corpo lúteo⁽²¹⁾, demonstrando que a regressão funcional (redução da P4 sérica), precede à regressão morfológica do corpo lúteo⁽²²⁾. Concentrações de P4 atingem valores máximos nos dias posteriores à estabilização da área e do volume do corpo lúteo (9º. dia)⁽¹⁹⁾, condição que foi verificada em nosso trabalho, uma vez que os valores máximos de P4 verificados situaram-se entre o 9º e o 16º dia do ciclo estral.

Nos bovinos, entre os dias 15 e 17 do ciclo, período crítico do início da luteólise, ocorre significativo aumento da secreção endometrial de $\text{PGF}_{2\alpha}$, na ausência de um embrião

viável⁽²³⁾, portanto os baixos níveis de P4 registrados no final do ciclo estral deveram-se a este fator, quando ocorreu a queda aos níveis circulantes basais (< 1,0 ng/mL). Estes achados foram evidenciados, no presente estudo nos dias 20, 21 e 22 do ciclo, dias que antecederam a próxima ovulação, corroborando os resultados verificados por Duchens et al. ⁽²⁴⁾ e Sunderland et al. ⁽²⁵⁾. As rápidas alterações observadas no padrão de secreção de P4 durante a luteólise não são acompanhadas de modificações significativas do CL, que tem seu volume reduzido pela metade, somente após 12 horas⁽²⁶⁾.

Os dados verificados no presente estudo confirmam a hipótese de que a CLIA pode ser utilizada para determinar a concentração de P4 em soro sanguíneo de bovinos. Sendo capaz de indicar presença ou ausência de corpo lúteo, constituindo-se em mais um método alternativo para determinação da P4

5. Conclusão

Concluiu-se que a CLIA evidenciou alta correspondência linear com os valores da ELISA validando a metodologia; a CLIA pode ser empregada, como um valioso método para as determinações hormonais da P4 sérica bovina; a CLIA pode proporcionar substancial ajuda às biotecnologias da reprodução (IATF, TE, TETF, Superovulação, FIV, dentre outras), ao evidenciar capacidade de determinar a concentração de P4 sérica nas fases folicular e luteal do ciclo estral de bovinos.

Declaração do conflito de interesses

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

Contribuições dos autores

Isabela da Silveira Padilha: Curadoria de dados - atividades de gerenciamento e execução dos dados.

Saulo Henrique Weber e Marcio Saporiski Segui: Análise formal - Aplicação de técnicas estatísticas, matemáticas, computacionais ou outras técnicas formais para analisar ou sintetizar dados de pesquisa.

Marina de Pauli Thomaz: atividades de levantamento de literatura e atualizações.

Tacia Gomes Bergstein-Galan: Gerenciamento do projeto - Responsabilidade de gestão e coordenação do planejamento e execução da atividade de pesquisa.

Carlos Alberto Mayora Aita: Recursos - Fornecimento de materiais de estudo, reagentes, materiais, pacientes, amostras de laboratório.

Luiz Ernandes Kozicki e Fernando Andrade Souza: Visualização - Preparação, criação e/ou apresentação do trabalho publicado, especificamente visualização/apresentação de dados.

Jose Carlos dos Santos Breda: Preparação, criação e/ou apresentação do trabalho publicado por aqueles do grupo de pesquisa original, especificamente revisão crítica, comentário ou revisão - incluindo as etapas de pré ou pós-publicação.

Referências

1. Alvarez RH, Massat JP, Meirelles CF. Diagnóstico precoce de gestação em bovinos pela dosagem de progesterona no leite utilizando um teste imunoenzimático (elisa) a campo. Rev Bras Reprod Anim. 1989;13(1): 25-32
2. Takai S, Kawazu S, Tsubaki S. Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Corynebacterium* (Rhodococcus) equi infection in foals. Amer J Vet Res. 1985; 46(10):2166-70. PMID: 4062024
3. Jericó MM, Mendonça BB, Otsuka M, Maganin Jr A, Larsson CE. Clinic And Surgery • Cienc Rural. 2002; 32 (2) DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782002000200012>

4. Rongen HAH, Hoetelmans RMW, Bult A. Chemiluminescence and immunoassays. *J Pharm Biomed Anal.* 1994;12:433-62. DOI: [http://doi.org/10.1016/0731-7085\(94\)80027-8](http://doi.org/10.1016/0731-7085(94)80027-8)
5. Machado LHA, Moutinho FQ. Validação do método de quimioluminescência para determinação de PTH intacto em cães. *Vet Zootec.* 2013; 20(1):84-90. (<https://rvz.emnuvens.com.br/rvz/article/download/1498/1001>)
6. Kozicki LE, Weber SH, Bacher LH. Determination of progesterone concentration during the estrous cycle in dairy cows using a chemiluminescence assay. *Rev Acad Cienc Anim.* 2018;16:e16006. DOI: <http://doi.org/10.7213/1981-4178.2018.16006>
7. Prus INH; Kozicki LE; Weber SH, Segui MS, Camargo CE; Bergstein-Galan TG; Weiss RR; Lara NSS, Catalano FAR. Serum progesterone profile in mares estrous cycle determined using immunochemiluminescence (CLIA). *Pferdeheilkunde-Equine Medicine.* 2022; 38(5):413-19. DOI: <http://doi.org/10.21836/PEM20220502>
8. Seadi C. Princípios básicos de imunologia. São Paulo, Ed. Ulbra. 248; 1998.
9. Ciarlini LRP, Ciarlini PC, Feitosa FLF. Quimioluminescência: princípio e aplicações. *Rev Edu Cont CRMV-SP.* 2002;5(2):181-87. Disponível em: <https://www.revistamvez-crmv.com.br/index.php/recmvz/article/view/3272>
10. Shaham-Albalancy A, Rosenberg M, Folman Y, Graber Y, Meidan R, Wolfenson D. Two methods of inducing low plasma progesterone concentrations have different effects on dominant follicles in cows. *J Dairy Sci.* 2000;83:2771-78. DOI: [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75173-3](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75173-3)
11. Mucciolo RG, Barberio JC. Níveis de progesterona no plasma sanguíneo, durante o ciclo estral e a gestação, de vacas Nelore (*Bos indicus*). *Rev Bras Reprod Anim.* 1983;7(1):11-21.
12. Edwards S. The effects of short term calf removal on pulsatile LH secretion in the postpartum beef cow. *Theriogenology.* 1985; 23(5):777-85. DOI: [http://doi.org/10.1016/0093-691x\(85\)90153-0](http://doi.org/10.1016/0093-691x(85)90153-0)
13. Henricks DM, Lamond DR, Hill JR, Dickey JF. Plasma progesterone concentrations before mating and in early pregnancy in the beef heifer. *J Anim Sci.* 1971;33(2):450-54. DOI: <http://doi.org/10.2527/jas1971.332450x>
14. Ramirez-Godinez JA, Kiracofe GH, Schalles RR, Niswender GD. Endocrine patterns in the postpartum beef cow associated with weaning: a comparison of the short and subsequent normal cycles. *J Anim Sci.* 1982 Jul;55(1):153-8. DOI: <https://doi.org/10.2527/jas1982.551153x>
15. Cardoso CA. Use of Chemiluminescence in the determination of circulating concentrations of progesterone, luteinizing hormones and follicle stimulating hormone in heifers Holstein. - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2018. Universidade Federal de Viçosa 2018. Thesis. <https://locus.ufv.br//handle/123456789/25750>
16. Grunert E, Birgel EH. Obstetrícia Veterinária, Ed. Sulina, Porto Alegre, Brazil, 1982; 323 p.
17. Gastal EL, Neves JP, Mattos RC, Petrucci BPL, Gastal MO, Ginther OJ. Miniature ponies: 1. Follicular, luteal and endometrial dynamics during the oestrous cycle. *Reprod Fertil Develop.* 2008; 20, 376-85. DOI: <https://doi.org/10.1071/RD07164>
18. Senger PL. Reproductive cyclicity. In: Senger PL. Pathways to pregnancy & Parturition, 3ed. Current Conceptions, USA. 2012. p. 140-201
19. Borges AM, Torres CAA, Ruas JRM, Junior VRR, Carvalho GR. Desenvolvimento Luteal e Concentrações Plasmáticas de Progesterona em Vacas das Raças Gir e Nelore. *R Bras Zootec.* 2003; 32(2):276-83. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982003000200005>
20. Gómez E, Salvetti P, Gatien J, Muñoz M, Martín-González D, Carrocera S, Goyache F. Metabolomic Profiling of *Bos taurus* Beef, Dairy, and Crossbred Cattle: A Between-Breeds Meta-Analysis. *J Agric Food Chem.* 2020 Aug 12;68(32):8732-8743. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02129>
21. Singh J, Pierson RA, Adams GP. Ultrasound image attributes of the bovine corpus luteum: structural and functional correlates. *J Reprod Fert.* 1997;109:35-44. DOI: <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1090035>
22. Ribadu AY, Ward WR, Dobson H. Comparative evaluation of ovarian structures in cattle by palpation per rectum, ultrasonography, and plasma progesterone concentrations. *Vet Rec.* 1994; 135:425-57. DOI: <https://doi.org/10.1136/vr.135.19.452>

23. Tanikawa M, Acosta TJ, Fukui T, Murakami S, Korzekwa A, Skarzynski DJ, Piotrowska KK, Park CK, Okuda K. Regulation of prostaglandin synthesis by interleukin-1alpha in bovine endometrium during the estrous cycle. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2005 Dec;78(1-4):279-90. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2005.09.003>
24. Duchens M, Forsberg M, Edqvist LE, Gustafsson H, Rodríguez-Martínez H. Effect of induced suprabasal progesterone levels around estrus on plasma concentrations of progesterone, estradiol-17beta and LH in heifers. *Theriogenology.* 1994;42(7):1159-69. DOI: [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)90864-8](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)90864-8)
25. Sunderland SJ, Crowe MA, Boland MP, Roche JF, Ireland JJ. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. *J Reprod. Fertil.*1994; 101(3):547-55. DOI: <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1010547>
26. Acosta TJ, Miyamoto A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum, formation and regression. *Anim Reprod Sci.* 2044; 82:127-40. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.022>