

# EFEITO DO TEMPO E DA TEMPERATURA, ENTRE A COLETA E A CENTRIFUGAÇÃO, NA CONCENTRAÇÃO DE PROGESTERONA DO SORO E PLASMA DE VACAS NELORE<sup>1</sup>

EZEQUIEL RODRIGUES DO VALLE<sup>2</sup> e MARGOT ALVES NUNES DODE<sup>3</sup>

**RESUMO** - O objetivo deste trabalho foi determinar os efeitos de tempo e temperatura de incubação, entre a coleta e a centrifugação, na concentração de progesterona em amostras de soro e plasma bovino. Setenta e duas amostras de sangue (com e sem heparina) coletadas de três vacas nelore prenhes, foram incubadas a 4 ou 28°C, durante 0, 1, 2, 4, 8 e 24 horas, centrifugadas após cada período de incubação, e o soro ou plasma armazenados a -20°C. A determinação dos níveis de progesterona foi efetuada por radioimunoensaio. Reduções significativas (superiores a 60%,  $P < 0,05$ ) nos níveis de progesterona, em relação aos valores iniciais, foram observadas nas amostras para obtenção de soro mantidas por mais de duas horas a 28°C ou por mais de quatro horas a 4°C. No plasma, perdas significativas (superiores a 78%,  $P < 0,01$ ) ocorreram após uma hora de incubação para amostras mantidas a 4 ou 28°C. Concluiu-se, portanto, que para a redução das perdas, as amostras devem ser mantidas a 4°C e centrifugadas imediatamente após a coleta.

Termos para indexação: hormônio, bovinos, zebuínos, sangue.

## TIME AND TEMPERATURE EFFECTS, BETWEEN COLLECTION AND CENTRIFUGATION, ON NELLORE COWS SERUM AND PLASMA PROGESTERONE CONCENTRATION

**ABSTRACT** - The objective of this study was to determine the effects of time and temperature, between collection and centrifugation, on the progesterone levels in serum and plasma samples. Seventy-two blood samples (with and without heparin) from three nelore pregnant cows were collected and incubated at 4 or 28°C during 0, 1, 2, 4, 8 and 24 hours. Immediately after each incubation period, the samples were centrifuged and the serum and plasma stored at -20°C until analyses. The evaluation of the progesterone concentration in the samples was done by radioimmunoassay. A significative reduction (over 60%;  $P < 0,05$ ) in relation to the initial values, in the serum levels of progesterone occurred after four hours in the samples stored at 4°C and after two hours in the samples at 28°C. The reductions in the levels of progesterone in plasma was over 70% ( $P < 0,01$ ) for the samples stored at 4 or 28°C. Thus, for the determination of progesterone levels, the blood samples must be centrifuged as quickly as possible after collection, and maintained at 4°C during this period.

Index terms: hormone, bovine, zebu, blood.

## INTRODUÇÃO

A quantificação de progesterona no soro ou no plasma bovino através de métodos analíticos (radioimunoensaio e enzimaimunoensaio)

é de vital importância na pesquisa e nas observações clínicas dos aspectos reprodutivos. A determinação da concentração de progesterona tem sido utilizada para monitorar a capacidade funcional do corpo lúteo (Mucciolo & Barberio 1983, Troxel & Kesler 1984, Edwards 1985) para o diagnóstico precoce da gestação (Henricks et al. 1971, Folman et al. 1973, Mucciolo & Barberio 1983) e para análise de distúrbios endócrinos em fêmeas bovinas (Ramirez-Godinez et al. 1982). No entan-

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 13 de novembro de 1990

<sup>2</sup> Eng. - Agr., Ph.D., EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (CNPGC), Caixa Postal 154, CEP 79001 Campo Grande, MS.

<sup>3</sup> Méd. - Vet., M.Sc., EMBRAPA/CNPGC.

to, o tempo e a temperatura de incubação das amostras, da coleta à centrifugação, podem afetar a concentração final de progesterona mais do que a precisão e a sensibilidade do método de análise a ser utilizado (Oltner & Edqvist 1982). Por este motivo, cuidados especiais devem ser observados no manuseio das amostras.

Os efeitos do tempo e da temperatura de incubação na concentração de progesterona em taurinos têm sido relatados (Oltner & Edqvist 1982, Vahdat et al. 1979, 1981, Wiseman et al. 1982/83). No entanto, não existem informações a respeito do efeito desses fatores na concentração de progesterona em fêmeas zebuínas. Como diferenças na morfologia e função do ovário entre taurinos e zebuínos têm sido observadas (Irvin et al. 1978, Randel 1984, Segerson et al. 1984), não é prudente extrapolar informações obtidas de bovinos europeus para os zebuínos.

Portanto, o presente trabalho tem por objetivo determinar: a) o efeito da temperatura e tempo de incubação na concentração de progesterona no soro e plasma de fêmeas zebuínas; b) o efeito da temperatura de centrifugação na concentração de progesterona em amostras de plasma bovinos, centrifugados imediatamente após a coleta; c) equações de regressão para representar as variações da concentração de progesterona no soro e plasma para as temperaturas e tempos de incubação estudados.

## MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se amostras de sangue da veia jugular de três vacas Nelore no terço médio da gestação, pertencentes ao rebanho do Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte, em Campo Grande, MS. Para a determinação dos efeitos do tempo e da temperatura de incubação, da coleta à centrifugação, foi coletado, em tubos vacutainer de 10 ml, um total de 24 amostras de sangue de cada animal (12 com anticoagulante: 40 U.I. heparina/tubo, e 12 sem anticoagulante). Em seguida as amostras para a obtenção de plasma e soro foram distribuídas aleatoriamente num fatorial 2x6, tendo como fatores: temperatura (4 e

28°C) e tempo de incubação (0, 1, 2, 4, 8 e 24 horas). Imediatamente após cada período de incubação as amostras para obtenção de plasma e soro, mantidas a 4 e 28°C, foram centrifugadas a 3000 rpm por 20 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C.

Para se determinar o efeito da temperatura de centrifugação na concentração de progesterona no plasma bovino, foram utilizadas oito amostras de sangue de um mesmo animal. Imediatamente após a coleta, quatro amostras foram centrifugadas em centrífuga refrigerada a 4°C e quatro em centrífuga não refrigerada.

Após a obtenção do soro e plasma, todas as amostras foram transferidas para frascos de vidro, previamente identificados, e armazenados a -20°C, para posterior análise.

A quantificação da concentração de progesterona nas amostras foi efetuada com o "kit" de radioimunoensaio de fase sólida "Coat-A-Count" (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, California, USA). Todas as amostras de soro ou plasma de cada animal foram analisadas, em duplicata, em ensaios individuais para evitar variações entre análises. Os valores encontrados foram expressos em ng/ml, representando a média de duas análises de cada amostra. A concentração inicial de progesterona de cada animal, determinada no tempo zero, foi definida como 100%. As concentrações de progesterona nos demais períodos de incubação, às diferentes temperaturas, foram expressas como percentagem média de progesterona em relação à média da concentração individual inicial (tempo zero).

Utilizou-se, na análise de variância, o procedimento GLM (SAS Institute 1985a) do experimento em fatorial (2x2x6) em blocos completamente casualizados, tendo anticoagulante (com ou sem heparina), temperatura de incubação (4 ou 28°C) e tempo de incubação (0, 1, 2, 4, 8 ou 24 horas) como efeitos fixos, e animal como efeito aleatório.

Para a obtenção das equações de regressão, que representem as variações dos níveis de progesterona em função do tempo e temperatura de incubação, os dados foram ajustados pelo procedimento NLIN (SAS Institute 1985b), utilizando-se o método Gauss-Newton, conforme à equação:

$$Y_i = a - b \cdot \log(t_i + 1),$$

onde

$Y_i$  = % média de progesterona no tempo  $t_i$   
 $a$  = percentagem inicial de progesterona

b = taxa de variação na concentração de progesterona em função do tempo

t<sub>i</sub> = tempo de incubação (horas).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resumo da análise de variância da concentração de progesterona no sangue bovino é apresentado na Tabela 1. O efeito da interação entre animal e anticoagulante não foi significativo ( $P > 0,05$ ). No entanto, as interações de animal com tempo ou temperatura de incubação foram significativas ( $P < 0,01$ ). Isto indica que, de acordo com o tempo ou temperatura de incubação, a magnitude de resposta variou de animal para animal. Resultados semelhantes foram também descritos por Vahdat et al. (1981) e Wiseman et al. (1982/83). A razão para esta variação é desconhecida, mas poderia estar associada a diferenças no número de moléculas de progesterona livres (não ligadas a proteína), uma vez que apenas estas conseguem atravessar a parede celular (Vahdat et al. 1981).

O efeito das interações entre anticoagulante e temperatura ou tempo de incubação foi significativo ( $P < 0,05$ ). Portanto, a determinado tempo ou temperatura de incubação, a concentração de progesterona difere entre amos-

tras tratadas com ou sem anticoagulante. Estas observações estão de acordo com os resultados obtidos por Holdsworth (1980), Vahdat et al. (1981), Wiseman et al. (1982/1983) e Vahdat et al. (1984). Estes autores demonstraram que a adição de anticoagulantes, como heparina, citrato de sódio e EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético) provoca uma queda rápida da concentração de progesterona, sendo mais acentuada em temperaturas superiores a 4°C.

A interação entre o efeito do tempo e da temperatura de incubação foi significativa ( $P < 0,01$ ) evidenciando a influência da temperatura de armazenamento durante o período de incubação na concentração de progesterona. Estes resultados confirmam observações anteriores (Vahdat et al. 1981, Wiseman et al. 1982/83) de que a concentração de progesterona no sangue bovino varia em função da temperatura e tempo de incubação.

As concentrações iniciais de progesterona (média  $\pm$  erro padrão) nas seis amostras de soro e nas seis de plasma centrifugadas imediatamente após a coleta (tempo zero), foram de  $5,48 \pm 0,35$  e  $6,43 \pm 0,37$  ng/ml, respectivamente. Os dados observados, não ajustados, das concentrações de progesterona no soro e plasma bovino, expressos em percentagem da concentração inicial, em relação aos efeitos do tempo e da temperatura de incubação, estão representados na Fig. 1.

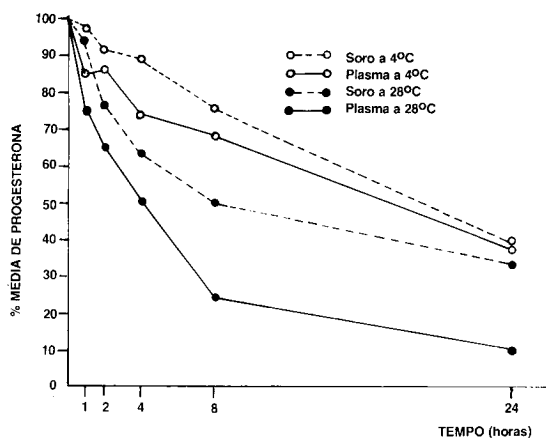
A concentração de progesterona nas amostras coletadas sem heparina e mantidas a 4°C apresentaram reduções de 24,7% ( $P < 0,01$ ) e 61,0% ( $P < 0,01$ ) após 8 e 24 horas de incubação, respectivamente. A primeira queda significativa (11,0%;  $P < 0,05$ ) ocorreu após 4 horas de incubação. No entanto, quando a temperatura de incubação se elevou para 28°C as reduções foram mais acentuadas (50,3% e 66,3%, após 8 e 24 horas, respectivamente,  $P < 0,01$ ). A primeira redução significativa (23%;  $P < 0,01$ ) nas amostras mantidas a 28°C ocorreu com duas horas de incubação, evidenciando o efeito da temperatura de incubação na concentração de progesterona. Estas observações estão de acordo com os resultados

**TABELA 1. Resumo da análise de variância da concentração de progesterona no sangue bovino.**

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	P > F
Animal (An)	2	1477,1667	0,0001
Anticoagulante (At)	1	2178,0000	0,0001
Temperatura (t°)	1	5033,3889	0,0001
Tempo (T)	5	7588,8667	0,0001
An x At	2	15,1665	0,6640
An x t°	2	166,0555	0,0184
An x T	10	157,7833	0,0007
At x t°	1	312,5000	0,0063
At x T	5	111,2000	0,0234
t° x T	5	466,2555	0,0001
At x t° x T	5	73,8333	0,1019
Erro	32	36,5642	

obtidos por outros pesquisadores (Vahdat et al. 1979, Wiseman et al. 1982/1983), onde foi demonstrado que o tempo e a temperatura de incubação influenciam na concentração de progesterona no soro. As primeiras reduções foram observadas imediatamente após a coleta, porém quedas significativas ocorreram uma a duas horas após a coleta (Wiseman et al. 1982/1983), com taxas mais elevadas para as amostras mantidas à temperatura ambiente.

As amostras de sangue, para obtenção de plasma, mantidas a 4°C apresentaram uma redução na concentração de progesterona de 31,3% ( $P < 0,01$ ) e 62,7% ( $P < 0,01$ ) após 8 e 24 horas de incubação, respectivamente. A primeira redução significativa (15%;  $P < 0,05$ ) ocorreu após uma hora de incubação. Quando as amostras foram mantidas à temperatura ambiente (28°C), as perdas foram mais elevadas (76,0% e 89,7%, após 8 e 24 horas, respectivamente;  $P < 0,01$ ). A primeira redução significativa (24,7%;  $P < 0,01$ ) ocorreu após uma hora de incubação a 28°C. Owens et al. (1980), Vahdat et al. (1981), Oltner & Edqvist (1982) e Wiseman et al. (1982/1983) também observaram que os níveis de progesterona no plasma diminuíram sensivelmente após uma hora de incubação e que essas reduções foram mais acentuadas nas amostras mantidas à temperatura ambiente.

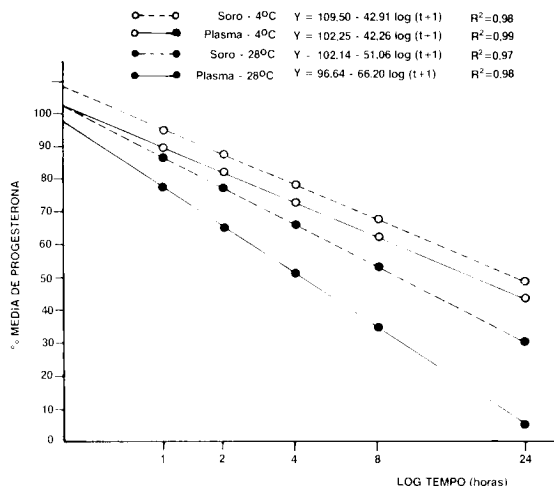


**FIG. 1.** Percentagem média de progesterona observada no soro e plasma bovino durante diferentes tempos e temperaturas de incubação.

As reduções na concentração de progesterona, para amostras mantidas à mesma temperatura, foram mais elevadas no plasma do que no soro ( $P < 0,01$ ). Estas observações estão em conformidade com resultados de trabalhos anteriores (Vahdat et al. 1981, Wiseman et al. 1982/83). As razões para estas reduções não são conhecidas, mas parecem estar associadas à ligação das moléculas de progesterona à superfície das frações celulares, onde seriam metabolizadas ou alteradas por fator(es) presente(s) no sangue (Vahdat et al. 1979). Se nas amostras com anticoagulante a interação das moléculas de progesterona com as frações celulares é maior, o metabolismo da progesterona deve ser também mais rápido. Estas observações estão de acordo com os resultados de Vahdat et al. (1984) que concluíram que a presença de células sanguíneas intactas era necessária para a redução dos níveis de progesterona. Além do mais, essa redução seria causada pelo metabolismo da progesterona e não pela ligação ou absorção de progesterona pelas moléculas. A presença da enzima 20  $\alpha$ -hidroxiesteróide dehidrogenase catalizando a conversão da progesterona em 20  $\alpha$ -dihidroprogesterona, no sangue e eritrócitos de várias espécies animais (Short 1958, Van der Molen 1968), suporta essa conclusão. Como a queda de progesterona é mais acentuada à temperatura ambiente, conclui-se também que a temperatura de incubação influencia o metabolismo da progesterona através da maior ou menor atividade da enzima.

O nível de progesterona das quatro amostras de sangue centrifugadas em centrífuga refrigerada ( $8,92 \pm 0,52$  ng/ml) não diferiu ( $P > 0,05$ ) do nível de progesterona das quatro amostras centrifugadas em centrífuga não refrigerada ( $8,66 \pm 0,56$  ng/ml). Portanto, a temperatura de centrifugação não afetou a concentração de progesterona nas amostras.

O gráfico e as equações de regressão, que representam as variações na concentração de progesterona no soro e plasma bovino, incubados por diferentes períodos a 4°C e 28°C, são apresentados na Fig. 2.



**FIG. 2.** Percentagem média de progesterona no soro e plasma bovino, estimada pelas equações de regressão, a diferentes tempos e temperaturas de incubação.

As equações de regressão ajustadas para diferentes tempos e temperaturas de incubação demonstraram que, com o aumento do tempo de incubação, houve um decréscimo na concentração de progesterona, independentemente da temperatura e da presença, ou não, de anti-coagulante. No entanto, pode-se observar que as quedas foram mais acentuadas quando a temperatura de incubação passou de 4°C para a temperatura ambiente (28°C).

Os coeficientes de determinação obtidos (Fig. 2) indicaram que as equações estimaram com precisão as variações que ocorreram na concentração de progesterona, em função do tempo e temperatura de incubação. Isto pode ser visto pelas comparações dos valores observados e os estimados (Tabela 2).

**TABELA 2.** Percentagem de progesterona observada (OBS.) e estimada (EST.) através das equações de regressão para soro e plasma bovino a diferentes temperaturas e tempo de incubação.

Variáveis		Tempo de incubação (horas)						r
		0	1	2	4	8	24	
Soro 4°C	OBS.	100,0	97,7	91,7	89,0	75,0	39,0	0,93
	EST.	109,5	96,6	89,0	79,5	68,6	49,5	
Soro 28°C	OBS.	100,0	93,7	77,0	63,3	49,7	33,7	0,99
	EST.	102,1	86,8	77,8	66,5	53,4	30,8	
Plasma 4°C	OBS.	100,0	85,0	86,7	74,0	68,7	37,3	0,97
	EST.	102,3	89,5	82,1	72,7	61,9	48,2	
Plasma 28°C	OBS.	100,0	75,3	65,7	51,0	24,0	10,3	0,99
	EST.	96,6	76,7	65,1	50,4	33,5	4,1	

r = coeficiente de correlação entre os valores observados e os estimados pelas equações de regressão

## CONCLUSÕES

1. O tempo e a temperatura de incubação influenciaram a concentração de progesterona nas amostras de soro e plasma de fêmeas zebuínas.

2. A temperatura de centrifugação das amostras não influenciou a concentração de progesterona.

3. As equações de regressão obtidas estimaram com precisão as reduções na concentração de progesterona, que ocorreram em função da temperatura e tempo de incubação.

4. O intervalo da coleta à centrifugação, para a obtenção de soro ou plasma, deve ser o menor possível e as amostras de sangue mantidas a 4°C após a coleta.

## REFERÊNCIAS

- EDWARDS, S. The effects of short term calf removal on pulsatile LH secretion in the postpartum beef cow. **Theriogenology**, v.23, n.5, p.777-785, 1985.
- FOLMAN, Y.; ROSENBERG, M.; HERZ, Z.; DAVIDSON, M. The relationship between plasma progesterone concentration and conception in postpartum dairy cows maintained on two levels of nutrition. **Journal Reproduction of Fertility**, v.34, n.2, p.267-278, 1973.
- HENRICKS, D.M.; LAMOND, D.R.; HILL, J.R.; DICKEY, J.F. Plasma progesterone concentrations before mating and in early pregnancy in the beef heifer. **Journal of Animal Science**, v.33, n.2, p.450-454, 1971.
- HOLDSWORTH, R.J. Measurement of progesterone in bovine plasma and preserved whole blood samples by a direct radioimmunoassay. **British Veterinary Journal**, v.136, p.135-140, 1980.
- IRVIN, H.J.; RANDEL, R.D.; HAENSLY, W.E.; SORENSEN, A.M. Reproductive studies of Brahman cattle. III. Comparison of weight, progesterone content, histological characteristics and 3- $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity in corpora lutea of Brahman, Hereford and Brahman x Hereford heifers. **Theriogenology**, v.10, n.6, p.417, 1978.
- MUCCILO, R.G.; BARBERIO, J.C. Níveis de progesterona no plasma sanguíneo, durante o ciclo estral e a gestação, de vacas Nelore (*Bos indicus*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.7, n.1, p.11-21, 1983.
- OLTNER, R.; EDQVIST, L.E. Changes in plasma progesterone levels during storage of heparinized whole blood from cow, horse, dog and pig. **Acta Veterinária Scandinavica**, v.23, p.1-8, 1982.
- OWENS, R.E.; ATKINS, D.T.; RAHE, C.H.; FLEGER, J.L.; HARMS, P.G. Time-dependent loss of radioimmunoassayable levels of progesterone following ambient temperature incubation of heparinized bovine blood. **Theriogenology**, v.13, n.4, p.305-309, 1980.
- RAMIREZ-GODINEZ, J.A.; KIRACOFÉ, G.H.; SCHALLES, R.R.; NISWENDER, G.D. Endocrine patterns in the postpartum beef cow associated with weaning: a comparison of the short and subsequent normal cycles. **Journal of Animal Science**, v.55, n.1, p.153-158, 1982.
- RANDEL, R.D. Seasonal effects on female reproductive functions in the bovine (Indian breeds). **Theriogenology**, v.21, n.1, p.170-185, 1984.
- SAS INSTITUTE INC. The GLM procedure. In: \_\_\_\_\_. **SAS user's guide: statistics**. 5. ed. Cary, 1985a. p.433-506.
- SAS INSTITUTE INC. The NLIN procedure. In: \_\_\_\_\_. **SAS user's guide: statistics**. 5. ed. Cary, 1985b. p.575-606.
- SEGERSON, E.C.; HANSEN, T.R.; LIBBY, D.W.; RANDEL, R.D.; GETZ, W.R. Ovarian and uterine morphology and function in Angus and Brahman cow. **Journal of Animal Science**, v.59, n.4, p.1026, 1984.
- SHORT, R.V. Progesterone in blood. I. The clinical determination of progesterone in peripheral blood. **Journal of Endocrinology**, v.16, p.415-425, 1958.
- TROXEL, T.R.; KESLER, D.J. The effect of progestin and GnRH treatments on ovarian function and reproductive hormone secretion of anestrous postpartum suckled beef cows. **Theriogenology**, v.21, n.5, p.699-711, 1984.
- VAHDAT, F.; HURTGEN, J.P.; WHITMORE, H.L.; JOHNSTON, S.D.; KETELSEN, C.L. Effect of time and temperature on bovine serum and plasma progesterone concentration. **Theriogenology**, v.12, n.6, p.371-374, 1979.
- VAHDAT, F.; HURTGEN, J.P.; WHITMORE, H.L.; SEGUIN, B.E.; JOHNSTON, S.D. Decline in assayable progesterone in bovine plasma: Effect of time, temperature, anticoagulant, and presence of blood cells. **American Journal of Veterinary Research**, v.42, n.3, p.521-522, 1981.
- VAHDAT, F.; SEGUIN, B.E.; WHITMORE, H.L.; JOHNSTON, S.D. Role of blood cells in degradation of progesterone in bovine blood.

- American Journal of Veterinary Research**, v.45, n.2, p.240-243, 1984.
- VAN DER MOLEN, H.J.; GROWN, D. Interconversion of progesterone and 20- $\beta$ -dihydroprogesterone and of androstenedione and testosterone in vitro by blood and erythrocytes. **Acta Endocrinology**, v.58, p.419-444, 1968.
- WISEMAN, B.S.; VINCENT, D.L.; THOMFORD, P.J.; SCHEFFRAHN, N.S.; SARGENT, G.F.; KESLER, D.J. Changes in porcine, ovine, bovine and equine blood progesterone concentrations between collection and centrifugation. **Animal of Reproduction Science**, v.5, p.157-165, 1982/1983.