

GLACIELLE GASPAR LEMOS

CONCENTRAÇÃO DOS METABÓLITOS DE ESTRADIOL E PROGESTERONA
FECAIS NO CACHORRO-DO-MATO-VINAGRE (*Speothos venaticus*) (LUND, 1842)
PELOS MÉTODOS DE RADIOIMUNOENSAIO E QUIMIOLUMINESCÊNCIA

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal, na Área de Concentração em Biotecnologia da Reprodução.

Orientadora: Isabel Candia Nunes da Cunha

Coorientadora: Valéria Amorim Conforti

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

AGOSTO 2014

GLACIELLE GASPAR LEMOS

CONCENTRAÇÃO DOS METABÓLITOS DE ESTRADIOL E PROGESTERONA
FCAIS NO CACHORRO-DO-MATO-VINAGRE (*Speothos venaticus*) (LUND, 1842)
PELOS MÉTODOS DE RADIOIMUNOENSAIO E QUIMIOLUMINESCÊNCIA

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal, na Área de Concentração em Biotecnologia da Reprodução.

Aprovada em 15 de agosto de 2014.

DSc. Célia Raquel Quirino – Doutora em Ciência Animal – Universidade Federal de Minas Gerais

Dsc. Rosemary Bastos – Doutora em Fisiologia – Universidade de São Paulo

Dsc. Isabel Candia Nunes da Cunha – Doutora em Medicina Veterinária –
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
(Orientadora)

Dsc. Valéria Amorim Conforti – Doutora em Animal Science – Washington State
University
(Coorientadora)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser meu PAI, meu caminho, minha força para enfrentar os momentos de dificuldade. Por proteger-me com suas asas, levantando-me, quando não conseguia resistir, e por colocar em meu caminho pessoas dispostas a me ajudar quando eu não enxergava mais saída. E pela dádiva de ser mãe, a mãe da Olívia.

Aos meus pais, irmãos, cunhado e sobrinha que sempre oraram e torceram por mim em toda a minha caminhada, apoiando-me incondicionalmente nas minhas escolhas, sendo meu alicerce e minha segurança, meus exemplos de vida e dedicação.

Ao meu amigo, meu companheiro, meu amor, Júnior, por fazer todo o possível em favor do meu crescimento profissional, confortando-me e incentivando-me nos momentos certos. Além de dividir comigo a bênção de sermos os pais da Olívia, esperada ansiosamente.

Aos meus amigos, Andressa, Juliana, Mariana, Teresa, Vanessa e Victor que, sabiamente, entenderam meus momentos de ausência por conta dos compromissos com este trabalho. A minha mais nova amiga, Paula, com suas orientações e companhia, tornando a rotina do mestrado bem mais leve e divertida.

A minha orientadora, Isabel Candia Nunes da Cunha, por estar disposta a enfrentar esta caminhada comigo, conduzindo-me em meio às dificuldades e permitindo que este trabalho fosse concluído, mesmo diante de tantos contratemplos.

Às professoras, Célia e Valéria, por aceitarem fazer parte da banca, além de participarem ativamente deste trabalho, sempre me direcionando com muita paciência e dividindo seus conhecimentos para o desenvolvimento desta dissertação. A Rose por também compor a banca, além de contribuir com sua admirável dedicação a este trabalho, foi uma companheira nos momentos de maior dificuldade ao longo deste mestrado.

Aos professores, Alberto, Maria Clara e Olney, e todos os do LQFPP (Laboratório de Química e Funções de Proteínas e Peptídeos), por estarem dispostos a colaborar,

cedendo gentilmente seus laboratórios e equipamentos para que pudesse ser realizada cada etapa deste trabalho.

A Márcia, que também se envolveu diretamente com este trabalho, dispendo-se incansavelmente a dividir seus conhecimentos durante a rotina de atendimentos do NuARC (Núcleo de Apoio a Reprodução de Carnívoros), contribuindo também com o meu despertar para a ultrassonografia.

Às queridas Jovana, Conceição e Valentina, da secretaria da Pós-Graduação, e a Mariane, da secretaria do LRMGA, por sempre fazerem de tudo para me ajudar e me tranquilizar, principalmente nos maiores problemas.

À FAPERJ (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro), pelo incentivo a esta pesquisa e por sempre contribuir com a evolução científica.

À UENF (Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro), instituição que me acolheu desde a graduação e me ofereceu todo o suporte físico e intelectual para meu aprendizado e crescimento da minha vida profissional na Medicina Veterinária.

“Tudo tem seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu: há tempo de nascer e tempo de morrer; tempo de plantar e tempo de arrancar o que se plantou.”

Eclesiastes 3. 1-2.

RESUMO

O conhecimento dos aspectos reprodutivos de animais silvestres é importante para a contribuição de estudos acerca da preservação da espécie em seu ambiente natural e para o manejo em cativeiro. Assim, o monitoramento dos hormônios sexuais, a partir de metabólitos fecais, pode auxiliar na conservação de espécies. Este trabalho objetivou comparar dois métodos de dosagem hormonal em extratos fecais liofilizados em cachorro-do-mato-vinagre (*Speothos venaticus*). Foram utilizadas 166 amostras fecais de duas fêmeas (fêmea A, n=80 e fêmea B, n=86) oriundas do Zoológico de Ilha Solteira, coletadas no período de março a dezembro de 2005. As amostras foram liofilizadas antes da extração dos metabólitos hormonais fecais. As concentrações de estradiol e progesterona foram dosadas por quimioluminescência e de radioimunoensaio utilizando *kits* específicos para a dosagem hormonal em humanos. Os resultados de ambos os métodos de quimioluminescência e de radioimunoensaio foram comparados (testes estatísticos). Os métodos tiveram resultados compatíveis ($P>0,05$), não havendo diferença significativa entre estes, mostrando que o monitoramento não invasivo de hormônios em extrato fecal contribuiu na determinação da concentração destes metabólitos nas fêmeas da espécie estudada. Este estudo revela a adequação dos métodos de quimioluminescência e radioimunoensaio para a quantificação dos metabólitos fecais de estradiol e progesterona na espécie *Speothos venaticus*.

Palavras-chave: *Speothos venaticus*, fezes, dosagem hormonal, quimioluminescência, radioimunoensaio.

ABSTRACT

Knowledge on basic reproductive physiology of wild species is crucial for effective management in captivity and could potentially contribute to *in situ* preservation of wild populations. Thus, assessing concentrations of reproductive hormones in fecal samples is an important tool in reproductive studies, particularly in wild species, which are more affected by stress due to physical restraint. The objective of this study was to compare two methods of hormone concentration assessment in lyophilized fecal samples from bush dogs (*Speothos venaticus*). One hundred and sixty-six fecal samples from two females (female A, n = 80 samples and female B, n = 86 samples) housed at Ilha Solteira Zoo – SP (latitude: 20° 25' 52" S, longitude: 51° 20' 17" W) were collected from March through December of 2005. Samples were lyophilized before fecal hormone metabolite extraction. Estradiol and progesterone concentrations were assessed via chemiluminescence and radioimmunoassay using commercially available kits for human hormone analyses. Results from both methods were compared by test statistic (Pearson correlation coefficient). There was no difference ($P > 0.05$) between the methods. This study demonstrates the suitability of chemiluminescence and radioimmunoassay for quantification of estradiol and progesterone fecal steroid metabolites in the *Speothos venaticus* species.

Key-words: *Speothos venaticus*, feces, hormone dosage, chemiluminescence, radioimmunoassay.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| INTRODUÇÃO | 9 |
| OBJETIVOS | 12 |
| Objetivos Gerais | 12 |
| Objetivos Específicos | 12 |
| REVISÃO DE LITERATURA | 13 |
| 1. <i>Speothos venaticus</i> | 13 |
| 2. Avaliação hormonal | 17 |
| 3. Quimioluminescência | 19 |
| 4. Radioimunoensaio | 21 |
| METODOLOGIA | 24 |
| 1. Animais | 24 |
| 2. Coleta de amostras fecais | 24 |
| 3. Liofilização e extração hormonal da amostras fecais | 25 |
| 4. Dosagens hormonais | 26 |
| 4.1. Método de Quimioluminescência | 26 |
| 4.1.1. Dosagem de progesterona | 27 |
| 4.1.2. Dosagem de estradiol | 28 |
| 4.2. Método de Radioimunoensaio | 29 |
| 4.2.1. Dosagem de progesterona | 30 |
| 4.2.2. Dosagem de estradiol | 31 |
| 5. Análise estatística | 33 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO | 34 |
| 1. Variações das concentrações hormonais | 34 |
| 2. Controle de qualidade | 40 |
| 3. Médias das concentrações hormonais | 41 |
| 4. Sazonalidade e dominância | 43 |
| 5. Correlação entre os métodos de dosagem hormonal | 47 |
| 6. Análise estatística | 47 |
| CONCLUSÕES | 49 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 50 |
| ANEXO | 56 |

INTRODUÇÃO

Atualmente, a conservação da fauna tem-se tornado uma preocupação cada vez mais frequente. Ainda assim, existe uma desagradável realidade que é o grande número de espécies ameaçadas de extinção em consequência, principalmente, do desenvolvimento dos espaços urbanos sem qualquer planejamento sustentável.

O conhecimento dos aspectos reprodutivos de animais silvestres é importante para a contribuição de estudos acerca de sua preservação em seu ambiente natural e para o manejo em cativeiro. Assim, o conhecimento da biologia reprodutiva de uma espécie constitui recurso importante para o manejo reprodutivo de uma espécie silvestre em cativeiro. A importância da criação de animais selvagens em cativeiro é a possibilidade de estas populações também funcionarem como base para a reconstrução de populações extintas em seus habitats naturais. No entanto, para que esta prática seja viável, é importante que os animais permaneçam na condição de cativos por um curto período de tempo, evitando o estresse pelo confinamento (SNYDER *et al*, 1996).

A partir disso, animais considerados em risco de serem extintos podem receber maior foco em estudos que resultem em alternativas para o aumento do número de indivíduos numa população selvagem ou cativa.

Uma espécie presente na lista de animais ameaçados de extinção é o cachorro-do-mato-vinagre (*Speothos venaticus*) que, apesar de ter sido descrita pela primeira vez há menos de 200 anos (a partir de fósseis), já é considerada em risco de desaparecer na natureza, sendo encontrada de maneira isolada e em populações de densidade reduzida, o que se deve, principalmente, à destruição de seu habitat e de mesmo modo, de suas presas (DE OLIVEIRA, 2009).

O ciclo reprodutivo de uma espécie é descrito por meio da mensuração dos hormônios sexuais, estrógeno e progesterona.

As dosagens hormonais podem ser feitas a partir de diversos tipos de

amostras, como sangue, urina e até mesmo fezes.

Em relação às análises de esteroides fecais, pode existir uma diferença interindividual no metabolismo de esteroides e rotas de excreção afetando as medidas dos níveis de metabólitos fecais em leopardos (WIELEBNOWSKI *et al.*, 2002). Os esteroides são metabolizados pelo fígado antes de serem excretados pela urina ou pela bile, indo para as fezes. Durante a passagem intestinal, os metabólitos esteroidais podem ser reabsorvidos indo para a circulação entero-hepática. A passagem intestinal causa um intervalo entre a circulação dos esteroides no plasma e seu aparecimento nas fezes. Este tempo é correlacionado com o tempo da passagem intestinal da bile para o reto (SCHWARZENBERGER, 2007).

Hormônios esteroides são excretados via intestinal através da bile, após depuração do sangue pelo fígado (WASSER *et al.*, 2002). Brown e colaboradores (1996) concluíram que os metabólitos da testosterona são excretados quase exclusivamente nas fezes no gato doméstico macho, que a mensuração dos metabólitos andrógenos permite monitorar a atividade esteroidogênica testicular no gato doméstico e que este procedimento também tem um potencial para ser uma valiosa ferramenta para acessar o *status* androgênico de espécies de felídeos ameaçadas de extinção.

A avaliação do padrão hormonal, por meio do processamento de amostras fecais, é de grande utilidade, uma vez que possibilita a verificação do caráter comportamental reprodutivo de espécies, excluindo o estresse pela captura para a coleta do material biológico, já que este pode interferir nas concentrações dos hormônios sexuais. A utilização deste tipo de amostra confere grande contribuição para a conservação e manejo de uma espécie, podendo ser aplicado em estudos com animais de vida livre (WASSER *et al.*, 2000).

A liofilização das amostras fecais é bastante utilizada, tendo como objetivo excluir alguma interferência da umidade durante a extração hormonal, nas amostras refrigeradas, visto ser um procedimento que proporciona a mudança de fase da água, de sólida diretamente para gasosa, o que evita a degradação das amostras.

Diferentes métodos de dosagem hormonal podem ser utilizados, como por exemplo, a quimioluminescência e o radioimunoensaio (RIE). Estes métodos utilizam a quantificação de antígeno e anticorpo para dosar as concentrações dos hormônios estudados, sendo possível detectar e contabilizar substâncias em pequenas quantidades (picogramas e nanogramas).

Alguns trabalhos foram realizados em outras espécies de canídeos, como o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) (CHELINI, 2006), e o cão doméstico (*Canis familiaris*) (MACHADO, 2000), utilizando estes métodos.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo comparar a metodologia de dosagem hormonal a partir do extrato fecal liofilizado de cachorro-do-mato-vinagre (*Speothos venaticus*) pelos métodos de radioimunoensaio e quimioluminescência.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo teve como objetivo a avaliação das concentrações de metabólitos de estradiol e progesterona em amostras fecais, por meio dos métodos de radioimunoensaio e quimioluminescência, do cachorros-do-mato-vinagre (*Speothos venaticus*).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparação da metodologia de dosagem hormonal a partir do extrato fecal de cachorro-do-mato-vinagre (*Speothos venaticus*) pelos métodos de radioimunoensaio e quimioluminescência.

Estimação da correlação entre os resultados hormonais obtidos pelos dois métodos de dosagem hormonal.

REVISÃO DE LITERATURA

1. *Speothos venaticus*

O cachorro-do-mato-vinagre (*Speothos venaticus*) pertence ao Reino Animalia, classe Mammalia, Ordem Carnívora, Família Canidae, também conhecido como jaguaracambé ou januária, e até poucas décadas atrás, era considerado fóssil (AMBIENTE BRASIL, 2012).

É um canídeo com corpo robusto, com orelhas, pernas e cauda bem curtas, cujo comprimento médio da cabeça e do corpo é de 74,3 cm, o da cauda 12,3 cm em média, com peso corporal entre 5 e 7 kg. A coloração varia entre o marrom claro e o escuro, tendo tonalidade mais clara na cabeça e no pescoço (AMBIENTE BRASIL, 2012).

A estrutura social desta espécie se caracteriza pela formação de grupos de 2 a 12 indivíduos (PRÓ-CARNÍVOROS, 2009). É uma espécie encontrada em áreas de florestas pluviais, decíduais, semidecíduais do nível do mar a até 1.500 m de altitude (MACHADO *et al.*, 2008). Estimativas preliminares de radiotelemetria sugerem que a área de vida de uma matilha seja de, pelo menos, 100 km², não dividida com outras matilhas. Quanto ao padrão de atividades, aparenta ser diurno, mas movimentos noturnos mostram ser muito frequentes (DE OLIVEIRA e DALPONTE, 2008).

No que se refere à dieta desta espécie, é considerada altamente carnívora, tendo como itens alimentares animais de porte considerável para o tamanho da espécie, como os grandes roedores caviomorfos até mesmo veados, podendo incluir aves e répteis. Porém, baseia-se também na ingestão de alguns frutos (MACHADO *et al.*, 2008).

Os grupos de cachorro-do-mato vinagre costumam se abrigar em ocos de árvores, tocas de outras espécies ou cavadas por eles (PRÓ-CARNÍVOROS, 2009).

Possuem uma adaptação para viver em regiões alagadas, representada por

membranas interdigitais, o que confere a esta espécie grande habilidade de deslocamento neste meio (AMBIENTE BRASIL, 2012). Esta afinidade com a água o torna conhecido no Peru como "cachorro d'água". Uma curiosidade que o difere dos canídeos em geral é a ausência de alguns molares (AMBIENTE BRASIL, 2012).

A fisiologia reprodutiva da espécie não parece apresentar sazonalidade, sendo a gestação de 67 dias em média, após a qual nascem em cerca de três a oito filhotes. É uma espécie altamente social, sendo observada a caçada grupal, com um rico repertório de vocalizações, vivendo em grupos familiares pequenos, nos quais apenas o casal dominante se reproduz (DE OLIVEIRA e DALPONTE, 2008).

O período de monta no cachorro-do-mato-vinagre, incluindo a corte e cópula, dura de 1 a 14 dias (DMOCH, 2000). Segundo Kleiman (1972), neste período, o casal passa mais tempo junto cheirando e lambendo um ao outro e, tanto o macho quanto a fêmea apresentam o reflexo de *Flehman* positivo em resposta à presença de urina, podendo ser observada a abertura da boca, lábios retraídos e deslizamento do maxilar sobre a mandíbula com a língua movida rapidamente para dentro e para fora da boca. A resposta a este reflexo parece ajudar o macho de muitas espécies (touros, carneiros e garanhões) a identificar as oportunidades de acasalamento por intermédio do seu órgão vomeronasal ou órgão de Jacobson, órgão acessório do olfato que possibilita a detecção de quantidades pequenas de feromônios das fêmeas (SWENSSON *et al.*, 1996).

A marcação de território é demonstrada pelo macho por meio do cheiro da urina, de forma diferente quando comparado ao de outras espécies de canídeos, expondo mais rapidamente o pênis e fazendo rápidos movimentos laterais (KLEIMAN, 1972).

Tanto os machos dominantes como os não dominantes executam a marcação pela urina, porém diferem em relação à frequência, sendo maior entre os machos alfa, principalmente, nas fases de proestro e estro das fêmeas (KLEIMAN, 1972).

De acordo com Kleiman (1972), a fêmea também possui este comportamento de marcação por meio da urina, apoiando-se de costas, com a cabeça para baixo,

urinando em seguida e, ao sair dessa posição, ela arrasta a região urogenital na superfície à qual se apoiava. Com este comportamento, as fêmeas buscam tornar seu cheiro mais perceptível para outros membros do grupo, aumentando a frequência durante as fases de proestro e estro.

Assim, segundo a literatura (KLEIMAN, 1972; PORTON, 1983; MACDONALD, 1996), a fêmea tem uma maior frequência de marcação de urina do que a dos machos, com os indivíduos de ambos os sexos, demonstrando um aumento nesta frequência quando expostos ao sexo oposto.

De acordo com alguns estudos (DRUWA, 1983; KITCHENER, 1971; KLEIMAN, 1968), a duração do interesse do macho pode terminar entre 1 a 3 dias após a última cópula. Porém, outros estudos sobre este tipo de comportamento relatam que a duração de interesse do macho pode ser de 8 a 23 dias. Possíveis explicações para essa diferença incluem tempos de monitoramento diferentes, como o uso de gravação em vídeo 24 horas antes e após o tempo de receptividade das fêmeas e o monitoramento apenas durante o período imediatamente circundante à receptividade feminina.

As fêmeas dão à luz em ninhos feitos em tocas de outros animais (usualmente tatus), sendo o macho encarregado pela procura do alimento (ZUERCHER *et al.*, 2005), trazendo-o para as fêmeas durante o período de amamentação (AMBIENTE BRASIL, 2012).

O cuidado paternal pode ocorrer basicamente de duas formas, direta e indireta, tanto quando o pai alimenta, carrega e protege os filhotes ou quando o pai se ocupa com a construção e manutenção de abrigos. A participação do macho na criação dos filhotes é uma ocorrência incomum entre os mamíferos, o que aumenta as chances de sobrevivência dos filhotes, garantindo o bem-estar da família (BAKER *et al.*, 1996).

Cazes (2004) acompanhou dois casais de cachorro-do-mato-vinagre por 3 meses e observou que o macho pertencente ao casal 1 apresentou comportamento de cuidado paternal, lambendo seus filhotes, além de levar comida para a fêmea no

ninho, onde ela passava a maior parte do tempo, possibilitando que esta fêmea apresentasse respostas maternas adequadas. No casal 2 do estudo de Cazes (2004), foi constatado que as fêmeas subordinadas (filhas mais velhas da primeira ninhada deste casal) carregavam suas irmãs (segunda ninhada do casal 2) pelo recinto, coincidindo com o que foi relatado por Beisiegel e Ades (2002), sugerindo que as fêmeas participam da criação de suas irmãs com comportamentos, como lambar, carregar e guardar os filhotes.

As fêmeas subordinadas observadas no trabalho de Cazes (2004) não apresentaram sinal de cio, mesmo quando atingiram a idade de maturidade sexual. Porém, de acordo com Nowak (1999) e Dmoch (2000), o início de comportamentos sexuais depende também de fatores sociais e não somente da sua maturidade sexual.

Embora pouco estudada, existem dados indicando que, apesar de amplamente distribuída, essa espécie nunca é abundante (DEMATTEO *et al.*, 2011; DE OLIVEIRA, 2009). Este canídeo distribuía-se, originalmente, por quase toda a América do Sul, desde a fronteira da Colômbia com o Panamá até Santa Catarina. Atualmente no Brasil, pode ser encontrado em florestas de Mata Atlântica, no Parque Estadual Intervales-SP, em campos úmidos no cerrado, como no Parque Nacional das Emas-GO e no Pantanal (AMBIENTE BRASIL, 2012).

Essa espécie parece ser naturalmente rara em sua região de ocorrência e é altamente suscetível à destruição de hábitat e doenças transmitidas por cães domésticos (DE OLIVEIRA, 2009). A perda de vegetação, causando declínios nas espécies de presas, contribuiu para o seu desaparecimento em algumas áreas (DE OLIVEIRA, 2009). Resultados provenientes de fragmentos florestais na Amazônia demonstram que o cachorro-do-mato-vinagre necessita de grandes áreas florestais (maiores do que 10.000 hectares) para apresentar, pelo menos, 40% de probabilidade de ocorrência e é pouco provável que consigam persistir fora de áreas de floresta contínua (MICHALSKI e PERES, 2005). É classificado pela União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) como uma espécie vulnerável e, pelo IBAMA, como ameaçada de extinção (PRÓ-CARNÍVOROS, 2009).

2. Avaliação hormonal

Métodos não invasivos de análise de hormônios ligados ao estresse e, principalmente, à reprodução, realizada a partir de amostras de fezes, urina e saliva, têm sido uma importante ferramenta para o monitoramento do bem-estar dos animais (WASSER *et al.*, 2002; DEHNHARD *et al.*, 2003; LUNDBERG, 2005; MCKENZIE e DEANE, 2005).

De acordo com Good (2003), a mensuração de esteroides no plasma reflete a situação de um indivíduo em um momento pontual, portanto, mudanças rápidas e em curto prazo nas concentrações de glicocorticoides, como aquelas provocadas por um novo ambiente ou situação, são determinadas com mais segurança utilizando amostras de plasma.

Para Brown e Wildt (1997), entretanto, uma única coleta de sangue pode produzir valores que representam apenas um único momento, o pico ou o ponto médio de uma secreção pulsátil.

Ensaio baseado no soro ou plasma mensuram o nível destes hormônios avaliados em resposta biológica imediata do animal (WINGFIELD *et al.*, 1994). Portanto, o uso de avaliação sanguínea é restrito a algumas espécies, visto que, normalmente, o animal precisa primeiro ser capturado. Em adição, a amostra pontual provida da mensuração do sangue pode não ser representativa para análises de níveis hormonais para um longo tempo, devido a padrões de secreção pulsátil dos glicocorticoides no sangue (HARPER e AUSTAD, 2000).

Para haver uma coleta sanguínea em animais selvagens, é necessário anestesiá-los e, apesar de anestésias ocasionais para este fim não comprometerem o potencial reprodutivo, a dinâmica da secreção hormonal (amplitude do pulso e frequência) pode ser interrompida temporariamente por drogas anestésicas específicas (JOHNSON e GAY, 1981).

De acordo com Brown e Wildt (1997), o uso de anestesia no intervalo periovulatório para coleta sanguínea em felídeos selvagens é contraindicado porque os dados subsequentes do hormônio podem estar comprometidos.

Os ensaios realizados a partir de metabólitos fecais de hormônios estão sendo agora utilizados em uma variedade de áreas (ciência animal, ecologia comportamental, biologia conservacionista, ornitologia e primatologia) para avaliar o *status* reprodutivo e das glândulas adrenais de diversas espécies (DEHNHARD *et al.*, 2001).

Estes métodos não invasivos são utilizados principalmente porque as amostras podem ser facilmente obtidas sem incômodo ao animal e sem colocá-lo em perigo durante a captura (WASSER *et al.*, 2000).

Nas fezes, há uma grande quantidade metabólitos de hormônios esteroides como os andrógenos, estrógenos e progestágenos; glicocorticoides como os corticosteroides e cortisol. Os hormônios proteicos de alto peso molecular, como os luteinizantes e o hormônio do crescimento, são destruídos no intestino e vão para a urina, não podendo ser avaliados nas fezes (WASSER *et al.*, 2002).

Segundo Brown e Wildt (1997), o monitoramento dos hormônios por métodos não invasivos proporciona o entendimento da biologia reprodutiva de animais, sendo esta uma das mais poderosas ferramentas de avaliação em zoológicos atualmente.

Como concluído por Brown e Wildt (1997), ao contrário da amostra sanguínea, a amostra fecal representa a concentração de metabólitos hormonais de períodos longos que, conseqüentemente, reflete o mínimo de oscilações. Outra vantagem deste tipo de amostra, citada por estes autores, é a de que os cientistas não têm um número limitado de amostras, as amostras podem ser coletadas por diversas vezes e por tempo indeterminado, sendo armazenadas em temperaturas abaixo de zero.

O protocolo de Brown e colaboradores (1994) consiste em utilizar as amostras armazenadas no freezer, procedendo à liofilização e, posteriormente, à maceração. Assim, as amostras são colocadas em um tubo com etanol (5 mL) em banho-maria (90°C) e, em seguida, centrifugadas.

Uma adaptação do protocolo de Graham e colaboradores (1995) é de que fezes frescas sejam adicionadas às fezes liofilizadas num tubo com etanol 80%. Em

seguida, levadas ao homogeneizador de sangue e centrifugadas, e o sobrenadante é colocado em outro tubo e levado ao freezer.

Segundo o protocolo de Schwarzenberger e colaboradores (1991), as fezes frescas também são adicionadas às fezes liofilizadas, porém, são colocadas num tubo com água destilada e metanol, levadas ao homogeneizador de sangue, adicionando-se éter de petróleo, e levadas ao agitador. Após este processo, o material é colocado na centrífuga e o sobrenadante é transferido para novos tubos e congelado.

Viau e colaboradores (2005) obtiveram amostras de cinco fêmeas de onça-pintada (*Panthera onca*), sendo duas adultas e três pré-pubescentes. Após estas amostras serem pesadas, procedeu-se à liofilização e à centrifugação e, em seguida, foram pesadas novamente para obtenção da porcentagem de umidade de cada amostra. A etapa de liofilização garantiu a padronização do peso do material fecal utilizado.

3. Quimioluminescência

A luminescência é a emissão de luz associada com a dissipação de energia de uma substância que se encontra em um estado eletricamente excitado. A dosagem de compostos em amostras por quimioluminescência, como método de dosagem hormonal, possui elevada sensibilidade, baixo custo, visto que se utilizam pequenas quantidades de reagentes, e é caracterizado como um procedimento simples (CRUVINEL, 2013).

Existem três tipos de luminescência (CRUVINEL, 2013):

- Fotoluminescência (fluorescência): é a excitação por fótons de luz infravermelha, ultravioleta ou visível.
- Bioluminescência: é mediada por enzimas em sistemas biológicos onde a enzima luciferase tem ação na luciferina (substrato) que sofre oxidação, o que leva este substrato a um estado de equilíbrio, liberando fóton de luz (vagalume,

bactérias marinhas).

- Quimioluminescência: é a excitação por reação química (método mais utilizado).

Tais testes que dependem da ligação de antígenos na superfície da célula em solução com anticorpos específicos são um método de escolha para quantificação de substâncias, como hormônios e marcadores tumorais (CRFRN, 2013).

Em 1667, foi feita a identificação da Bioluminescência, porém, somente em 1877 foram descritos os compostos luminescentes. Após 70 anos desta descrição, em 1947, foi identificada a luciferase presente no vagalume e, no ano de 1952, a luciferase foi empregada em um ensaio, mas não se obtiveram resultados adequados. O primeiro ensaio quimioluminescente utilizando o luminol ocorreu em 1976 e, entre 1978-1994, foram caracterizados os ésteres de acridina como marcadores em imunoenaios (CRUVINEL, 2013).

A quimioluminescência quantifica o antígeno ou o anticorpo presente em fluidos corporais. Um dos dois reagentes é conjugado a uma substância que, quando ativada, emite luz visível. Então, a emissão de luz é proporcional ao reagente pesquisado (REBOUÇAS, 2010).

A reação entre o antígeno-anticorpo, marcada com fosfatase alcalina, hidrolisa o substrato quimioluminescente, gerando um produto instável o qual, após estabilização, gera fótons de luz medidos por FM (Fluorimetria), cuja função é transformar a luz emitida pelos fótons em impulsos elétricos (CPS) (CRFRN, 2013).

Como vantagens, a quimioluminescência possui maior sensibilidade, eficiência, simplicidade e segurança que os radioimunoensaios (RIE) (CRFRN, 2013). Apresenta-se como opção de ensaios com elevada sensibilidade e especificidade adequada, sendo um exame basicamente automatizado e rápido, podendo analisar várias amostras, além de quantificar distintas moléculas, de uma só vez (REBOUÇAS, 2010).

Para a utilização dos derivados de luminol, além de necessitar de um catalisador, este procedimento apresenta uma série de interferências de fundo ao emitir sua luz, ocorrendo uma reação lenta e gradual, dependente de pH (REBOUÇAS, 2010). Quando se apresenta conjugada com enzimas do reagente, ocorre redução da emissão de luz (CRUVINEL, 2013).

Já com os ésteres de acridina, o processo não requer um catalisador e apresenta baixas interferências de fundo, além de ser muito estável, com grande vida média. (CRUVINEL, 2013). Com estes ésteres, o processo tem alto rendimento (linear), o tempo de reação é rápido (mediação mais fácil), a conjugação não limita o rendimento e possui alta sensibilidade (REBOUÇAS, 2010).

A técnica se desenvolve da seguinte forma: uma microesfera de poliestireno é revestida com o anticorpo monoclonal contra o antígeno analisado. É adicionado o soro do paciente que é incubado com agitação intermitente e, posteriormente, procede-se à lavagem para retirada do antígeno não fixado. Acrescenta-se então o anticorpo monoclonal específico no antígeno pesquisado conjugado à enzima, incubando o conjugado e lavando-o mais uma vez para retirar o anticorpo não fixado. O substrato da enzima é adicionado; em seguida, leva-se para a incubação. Essa adição sofre hidrólise na presença da enzima, produzindo substâncias instáveis que geram emissão de fótons (luz) (REBOUÇAS, 2010).

A energia química gerada como resultado da dissociação de ligações fracas produz compostos intermediários em um estado eletronicamente excitado que, quando retornam ao estado de energia inicial, emitem a luz que é medida (CRUVINEL, 2013).

Estes fótons são medidos por meio de um fotomultiplicador (PMT) que tem a função de transformar a luz emitida pelos fótons em impulsos elétricos. Estes são lidos em "contagens" de luz por segundo (CPS). Essa unidade é proporcional à quantidade de antígenos presentes na amostra (REBOUÇAS, 2010).

4. Radioimunoensaio

O radioimunoensaio foi a primeira técnica imunológica padronizada capaz de

detectar e quantificar substâncias de ordem de nano a picogramas. Em 1959, Berson e Yalow executaram o primeiro radioimunoensaio para quantificação de insulina. A partir de então, torna-se possível determinar qualquer tipo de molécula biológica, desde que haja um receptor específico e que a molécula biológica possa ser marcada (GUEDES, 2010). Este método utiliza um dos reagentes marcados, Ag ou Ac para quantificar o Ag ou Ac presentes na amostra (CRFRN, 2013).

O termo radioimunoensaio é mais empregado em ensaios com antígenos marcados, porém, quando se trata de ensaios com anticorpos marcados, o termo apropriado é imunorradiométrico (IRMA) (GUEDES, 2010), que é o ensaio mais utilizado atualmente (CRFRN, 2013).

Trata-se de uma técnica que apresenta alta sensibilidade, conferida pela detecção radioativa e elevada especificidade. Devido a esta especificidade, os ensaios podem acontecer diretamente no líquido biológico e, por isso, o volume de amostra pode ser menor e formada de uma grande variedade de compostos (LABORATÓRIO DE FARMÁCIA NUCLEAR, 2013).

A sensibilidade desta técnica permite dosar substâncias em concentrações da ordem de ng/mL, pg/mL e até fg/mL. Antes do advento desta técnica, muitas substâncias eram dosadas por meio de ensaios biológicos e, em muitos casos, não era possível realizar o doseamento (LABORATÓRIO DE FARMÁCIA NUCLEAR, 2013).

Devido a sua alta sensibilidade, o radioimunoensaio permite dosagem de substâncias não encontradas em concentrações suficientes para serem percebidas por outras técnicas, podendo ser dosadas substâncias como polipeptídeos, catecolaminas, esteroides, antibióticos, hormônios tireoidianos, proteínas, vitaminas, drogas e outras. Esta técnica é utilizada com eficiência na identificação do vírus da Hepatite B e como marcador tumoral (GUEDES, 2010).

Os seus princípios se baseiam na reação de competição por um receptor comum entre uma substância a ser determinada e a mesma substância marcada radioisotopicamente e, como componentes, temos o anticorpo radioativo, o antígeno

radioativo, a amostra a ser testada e o leitor radiométrico (GUEDES, 2010).

Neste método, podem ser citados, como os marcadores mais utilizados, o I 125 e ^3H (trítio). O I 125 é o radioisótopo mais empregado e muito utilizado em dosagem de hormônios proteicos. Este produz a radiação gama, tendo meia vida de 57,5 dias e ligando-se facilmente aos resíduos de tirosina das proteínas. Sua estabilidade é menor que a do ^3H (GUEDES, 2010).

O ^3H produz radiação beta, com uma estabilidade maior do que o I 125, é bastante empregado em dosagem de esteroides (GUEDES, 2010).

Existem alguns tipos de RIE para quantificação de Ag: competição com Ag marcado, competição com Ac marcado, sanduíche ou captura de Ag, Paper Radioimmunosorbent Test (PRIST) e Radioallergosorbent Test (RAST), sendo estes dois últimos utilizados para a detecção de IgE (GUEDES, 2010).

Dias e Oliveira (2006), utilizando andrógenos e estrógenos de amostras de excretas cloacais de 50 aves da família Psittacidae, previamente sexadas, observaram que 70% das aves tiveram o sexo confirmado pela técnica do radioimunoensaio.

Korndörfer e colaboradores (1998) extraíram P4 a partir de fezes e verificaram se o perfil plasmático da P4 durante a gestação foi refletido na P4 fecal total de coelhas gestantes. O plasma e as fezes foram coletados de 11 coelhas durante o período de 42 dias. A P4 total foi medida por meio de RIE em fase sólida, com I 125-P4 como marcador. Os níveis de P4 plasmática e fecal foram comparados com os de coelhas gestantes e castradas. Foi possível diferenciar a P4 total extraída, a partir do 2º dia até 28 dias depois do cio.

Reche Júnior (2013) avaliou a atividade adrenocortical, pela mensuração da concentração de corticosterona fecal, dos gatos que vivem confinados em colônias, usando como controle gatos que vivem isoladamente e sem disputa por território.

METODOLOGIA

1 - Animais

Os animais utilizados na coleta das amostras fecais foram duas fêmeas de cachorro-do-mato-vinagre (*Speothos venaticus*), adquiridas por empréstimo do Zoológico de Americana - SP pelo Zoológico de Ilha Solteira – SP no ano de 2004, sendo recebidas já adultas e sem o registro do ano de nascimento. Elas viviam sozinhas no mesmo recinto que era do tipo exposição, constituído por abundante área verde, fuma e aberto ao público. Para a alimentação destes animais era fornecido carne bovina, pescoço de frango, ratos, frutas, legumes e ração canina. Estas fêmeas foram identificadas como A (*studbook # 1227*), pesando 6,0 kg e B (*studbook # 1118*), pesando 4,8 e vieram a óbito no ano de 2007 em decorrência de um surto de Leishmaniose.

2 - Coleta de Amostras Fecais

Foram coletadas, no Zoológico de Ilha Solteira/SP (latitude: 20° 25' 52" sul, longitude: 51° 20' 17" oeste), 201 amostras de duas fêmeas de cachorro-do-mato-vinagre, no período de março a dezembro de 2005, e enviadas via SEDEX® ao Núcleo de Apoio à Reprodução de Carnívoros (NuARC) do Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal (LRMGA) da UENF.

Porém, 35 amostras (17,41%) não foram utilizadas nesta análise, visto que, durante a etapa de liofilização, não apresentaram perda de umidade adequada para a continuação do experimento. Sendo assim, as dosagens foram realizadas em 166 amostras (80 para a fêmea A e 86 para a fêmea B)

Foram identificadas 80 amostras da fêmea A (*Studbook # 1227*) e 86 amostras da fêmea B (*Studbook # 1118*) e, posteriormente, embaladas uma a uma em sacos plásticos do tipo Ziploc®, 8,5 x 12,5 cm e armazenadas congeladas a -20°C até a análise.

Tabela 1 – Fêmeas (n=2) de cachorro-do-mato-vinagre (*Speothos venaticus*) utilizadas no presente estudo e amostras fecais coletadas no Zoológico de Ilha Solteira/SP, no período de março a dezembro de 2005.

| Animal (ID) | Studbook | Peso | Nº de amostras |
|--------------------|-----------------|-------------|-----------------------|
| Fêmea A | #1227 | 6,0 | 80 |
| Fêmea B | #1118 | 4,8 | 86 |

3 - Liofilização e extração hormonal das amostras fecais

A metodologia de extração utilizada neste trabalho é uma adaptação da técnica descrita por Brown e colaboradores (1994).

As amostras foram previamente liofilizadas a -50°C durante 3 dias consecutivos, para eliminar qualquer presença de umidade, o que poderia alterar os resultados no momento da extração hormonal.

Para este procedimento, a cada saco contendo uma amostra foi adaptado um gargalo de garrafa pet, sem tampa, preso com esparadrapo colocando somente uma gaze para fechar a abertura.

Três tipos de liofilizadores foram utilizados durante este estudo: o primeiro foi o liofilizador (Delta 1-30K da marca Christ, Munique, Alemanha). Porém, devido à necessidade de manutenção deste equipamento, foi necessária a substituição pelo liofilizador de bancada (L101 da marca Liotop, São Paulo, Brasil).

Após serem retiradas do liofilizador, ainda dentro do saco Zip, as amostras foram trituradas manualmente a fim de pulverizá-las. Aproximadamente 0,2 g de cada amostra foram acondicionando, em tubos de vidro com tampas rosqueadas, e identificados. A extração ocorre quando adicionados 5 mL de etanol a 90% (diluídos em 10% de água destilada) e, com o auxílio de um Vortex (QL Vortex 901, da marca Biomixer, EUA), este material foi misturado por 20 segundos.

Após este procedimento, os tubos com o material fecal liofilizado juntamente com o etanol (90%) foram colocados no homogeneizador (Homogeneizador de Sangue AP 22, Phoenix - EUA), por 12 horas (*overnight*). Em seguida, as amostras foram centrifugadas (2500 x rpm por 20 minutos a 4°C). O volume de 5 mL do sobrenadante de cada amostra foi retirado com auxílio de uma pipeta de Pasteur e envasado em dois tubos tipo *ependorfs* de 1,5 mL (duplicatas) do extrato fecal, mantendo em congelamento (-20°C) até o momento da dosagem hormonal.

A extração hormonal ocorre quando as amostras recebem o etanol 90% e são homogeneizadas.

Antes de proceder as dosagens, foi executada nova centrifugação (2500 x rpm por 20 minutos a 4°C) para remover partículas de fezes que porventura tenham ficado no sobrenadante. Em seguida, o sobrenadante de cada amostra foi envasado em novos tubos de microcentrífuga do tipo *ependorfs* em duplicata.

4 - Dosagens hormonais

4.1 - Método de Quimiluminescência

O método de quimiluminescência foi utilizado para executar as dosagens dos hormônios progesterona e estradiol a partir de extratos fecais, sendo estas dosagens determinadas pelo Setor de Endocrinologia do Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal (LRMGA) da UENF. As concentrações de progesterona e estradiol foram determinadas por um sistema automatizado de quimiluminescência Immulite I[®], Siemens Healthcare Diagnostics Ltd. (Los Angeles, CA, USA), utilizando um imunoenensaio competitivo de fase sólida que se baseia na tecnologia de quimiluminescência enzimática direta.

Os procedimentos laboratoriais foram realizados de acordo com a metodologia proposta pelo fabricante.

A concentração de cada amostra dada pelo aparelho (em ng/mL de extrato fecal para progesterona e pg/mL de extrato fecal para estradiol) foi multiplicada pelo

fator de diluição da amostra em água destilada (executada antes das dosagens) e, em seguida, multiplicou-se por 5 (5 mL de etanol adicionado na extração). Como resultado final, dividiu-se cada um destes valores pelo seu respectivo peso (em gramas), medido após a liofilização e maceração, sendo a unidade para progesterona dada em ng/g de fezes liofilizadas e, para estradiol, dada em pg/g de fezes liofilizadas. Abaixo, seguem as fórmulas utilizadas:

a) Equação aplicada nos resultados obtidos para progesterona e estradiol:

$$CF = \frac{C \times D \times 5}{P}$$

Onde:

CF = concentração final

C = concentração fornecida pelo aparelho

D = diluição empregada

5 = constante referente ao volume de etanol adicionado para a extração

P = peso de cada amostra após a liofilização

4.1.1 – Dosagem de progesterona

As amostras foram diluídas a uma concentração de 20% (v/v) em água destilada, sendo pipetadas nos copos numerados do equipamento, um volume total de 200 µl (40 µl da amostra + 160 µl de água destilada) para cada amostra.

As amostras 67 e 70 foram dosadas novamente, visto que obtiveram, respectivamente, concentrações acima e abaixo do limite de detecção do aparelho. Assim, foram feitas novas dosagens com diluições diferentes, sendo a amostra 67 diluída a 10% (20 µl da amostra + 180 µl de água destilada) e a amostra 70, diluída a 40% (80 µl da amostra + 120 µl de água destilada).

Desta forma, cada copo foi encaixado na bandeja móvel do aparelho em ordem numérica, alternados por uma unidade teste. Assim, procedeu-se à leitura por meio do Immulite I[®], Siemens Healthcare Diagnostics Ltda. (Los Angeles, CA, USA).

Cada uma destas unidades-teste contém uma esfera (fase sólida) revestida com anticorpo de coelho policlonal antiprogesterona.

No procedimento de quimioluminescência, a amostra e o reagente ficaram em incubação juntamente com a esfera revestida com anticorpo por 30 minutos. Durante esse período, a progesterona da amostra competiu com a progesterona conjugada às enzimas do reagente por um número limitado de locais de ligação do anticorpo na esfera. A amostra e o conjugado enzimático não ligados foram eliminados por meio de lavagens centrífugas. Por fim, o substrato quimioluminescente foi adicionado à unidade-teste que contém a esfera, o que produziu um sinal proporcional à quantidade de enzima ligada.

Este sinal é lido como a concentração do hormônio progesterona (ng/mL de extrato fecal) presente em cada amostra de extrato fecal analisada. A concentração de cada amostra dada pelo aparelho foi aplicada na fórmula descrita no subitem 5.1 e o resultado dado em ng/g de fezes liofilizadas.

4.1.2 - Dosagem de estradiol

As amostras foram diluídas a uma concentração de 10% (v/v) em água destilada, sendo pipetadas nos copos numerados do equipamento, um volume total de 200 µl (20 µl da amostra + 180 µl de água destilada) para cada amostra.

Algumas amostras foram novamente dosadas, visto que obtiveram concentrações acima ou abaixo dos limites de detecção do aparelho. Assim, foram feitas novas dosagens com diluições diferentes (Tab. 2).

Tabela 2: Amostras e diluições correspondentes, cujas concentrações obtidas pela diluição a 10% (v/v) apresentaram-se acima ou abaixo dos limites de detecção do aparelho, utilizadas na dosagem de estradiol (E2) pelo método de quimioluminescência:

| NÚMERO DE IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA | DILUIÇÕES |
|---|---|
| 1, 4, 72, 90, 98 e 141. | 5% (10 µl da amostra + 190 µl de água destilada) |
| 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 13, 14, 15, 16, 20, 24, 26, 31, 40, 41, 46, 50, 53, 73, 78, 80, 91, 103, 122, 124, 128 e 142. | 20% (40 µl da amostra + 160 µl de água destilada) |

Desta forma, cada copo foi encaixado na bandeja móvel do aparelho em ordem numérica, alternados por uma unidade-teste. Assim, procedeu-se à leitura por meio do Immulite I[®], Siemens Healthcare Diagnostics Ltda. (Los Angeles, CA, USA)

O princípio do procedimento se iguala ao da progesterona, com exceção do período de incubação que, no caso da dosagem de estradiol, foi de 60 minutos, com a amostra e o conjugado enzimático não ligados eliminados por sucessivas lavagens.

Este sinal é lido como a concentração do hormônio estradiol (pg/mL de extrato fecal) presente em cada amostra de extrato fecal analisada. A concentração de cada amostra dada pelo aparelho foi aplicada na fórmula descrita no subitem 5.1 e o resultado dado em pg/g de fezes liofilizadas.

4.2 – Método de Radioimunoensaio (RIE)

As concentrações de progesterona e estradiol dos extratos fecais foram determinadas pelo Setor de Comportamento e Bem-estar Animal do Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal (LRMGA) da UENF. As

concentrações de progesterona e estradiol foram determinadas pela técnica de radioimunoensaio em fase sólida, sendo utilizado o conjunto diagnóstico comercial da Immunotech® Beckman Coulter Laboratories (Marseille, France).

4.2.1 - Dosagem da progesterona

No dia do ensaio, o conjunto diagnóstico comercial e as amostras dos extratos fecais foram deixados em torno de 30 minutos em temperatura ambiente antes do início do ensaio.

Para a construção da curva de calibração, foram rotulados:

A) 4 tubos de polipropileno (não revestidos com anticorpo) de 12 x 75 mm para as contagens totais (T) e ligações não específicas (NSB) em duplicatas;

B) 18 tubos revestidos com anticorpos de progesterona, sendo: dois tubos para P_0 (ligação máxima com o anticorpo para a progesterona na ausência do padrão ou desconhecido) e dois tubos para cada calibrador (padrão) em ordem crescente, correspondendo do Padrão 1 (P_1 - 0,025 ng/mL) ao Padrão 8 (P_8 - 45 ng/mL);

C) 2 tubos foram utilizados para o controle do ensaio de valor conhecido fornecido pelo fabricante;

D) 75 tubos (primeiro ensaio) e 182 tubos (segundo ensaio) revestidos com anticorpos de progesterona para as amostras dos extratos fecais.

Após a rotulagem dos tubos, como descrito acima, foram pipetados 50 μ l do calibrador A nos tubos NSB e P_0 ; 50 μ l dos calibradores remanescentes (padrões de P_1 a P_8); 50 μ l dos controles e 50 μ l das amostras.

Em todos os tubos, foram adicionados 0,5 mL de progesterona 125 I 10 minutos após pipetar os calibradores (padrões), controles e amostras. Os tubos foram agitados em *shaking* vertical de velocidade de 200 rpm durante 1 hora à temperatura ambiente. Após este período, todo o líquido contido nos tubos foi

aspirado por uma bomba a vácuo, exceto o dos tubos T (contagens totais). A leitura foi realizada por meio do contador gama Wizard 2470, Perkin Elmer (EUA).

Foram realizados dois ensaios. O controle de qualidade do RIE foi realizado pelo coeficiente de variação intraensaio para cada ensaio, sendo de 0,70% e 0,16%, e o coeficiente de variação interensaio foi de 0,5%. A sensibilidade mínima detectada para os dois ensaios foi 0,01 ng/mL. Após as dosagens, foi realizada a conversão das concentrações de progesterona dos extratos fecais expressas em ng/g de fezes.

4.2.2 - Dosagem do estradiol

Para a dosagem de estradiol pelo método de RIE, foram selecionadas algumas amostras, tentando seguir o padrão de uma amostra (coleta) a cada 15 dias, utilizando, assim, somente um *kit* para esta dosagem, já que não houve a possibilidade de aquisição de mais *kits* para este procedimento. Portanto, das 166 amostras totais, 35 foram dosadas neste procedimento, sendo 17 da fêmea A (*studbook* # 1227) e 18 amostras da fêmea B (*studbook* # 1888).

No dia do ensaio, o conjunto diagnóstico comercial e as amostras dos extratos fecais foram deixados em torno de 30 minutos em temperatura ambiente antes do início do ensaio. O estradiol ^{125}I foi diluído em 54 mL em tampão fosfato contendo azida sódica.

Para a construção da curva de calibração, foram rotulados:

A) 4 tubos de polipropileno (não revestidos com anticorpo) de 12 x 75 mm para as contagens totais (T) e ligações não específicas (NSB) em triplicatas;

B) 18 tubos revestidos com anticorpos de estradiol sendo: dois tubos para P_0 (ligação máxima com o anticorpo para o estradiol na ausência do padrão ou desconhecido) e dois tubos para cada calibrador (padrão) em ordem crescente, correspondendo do Padrão 1 (P_1 – 6,0 pg/mL) ao Padrão 8 (P_8 - 5017 pg/mL);

C) 2 tubos foram utilizados para o controle do ensaio de valor conhecido fornecido pelo fabricante;

D) 76 tubos revestidos com anticorpos de estradiol para as amostras dos extratos fecais;

Após a rotulagem dos tubos, como descrito acima, foram pipetados 100 µl do calibrador 0 nos tubos NSB e P₀; 100 µl dos calibradores remanescentes (padrões de P1 a P8); 100 µl dos controles e 100 µl das amostras dos extratos fecais.

Em todos os tubos, foram adicionados 0,5 mL de estradiol ¹²⁵I no espaço de 10 minutos após pipetar os calibradores (padrões), controles e amostras. Os tubos foram agitados em *shaking* vertical de velocidade de 200 rpm durante 3 horas à temperatura ambiente. Após este período, todo o líquido contido nos tubos foi aspirado por uma bomba a vácuo, exceto o dos tubos T (contagens totais). A leitura foi realizada por meio do contador gama Wizard 2470, Perkin Elmer (EUA).

O controle de qualidade do RIE foi realizado por meio do coeficiente de variação intraensaio, sendo de 0,7%. Como foi realizado apenas um ensaio, não houve o cálculo do coeficiente de variação interensaio. A sensibilidade mínima detectada para o ensaio foi de 4 pg/mL. No método de quimioluminescência, não foi executado este controle de qualidade.

Após as dosagens, foi realizada a conversão das concentrações de estradiol dos extratos fecais. A concentração de cada amostra dada pelo aparelho (em ng/mL de extrato fecal para progesterona, e pg/mL de extrato fecal para estradiol) foi dividida por seu respectivo peso (em gramas), medido, após a liofilização e maceração, sendo a unidade dada para progesterona em ng/g de fezes liofilizadas e, para estradiol, em pg/g de fezes liofilizadas. Abaixo, seguem as fórmulas utilizadas:

a) Equação aplicada aos resultados obtidos para progesterona e estradiol:

$$CF = \frac{C}{P}$$

Onde:

CF = concentração final

C = concentração fornecida pelo aparelho

P = peso de cada amostra após a liofilização

5 – Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados por meio do programa SAS System for Windows (SAS, 2000).

Para a descrição dos resultados, foram calculadas as médias mensais e seus respectivos desvios-padrão das concentrações dos hormônios estradiol e progesterona obtidos de cada fêmea, em ambos os métodos de dosagem hormonal, sendo executada a estatística descritiva (Tukey).

A análise de correlação de Pearson foi utilizada para verificar a relação entre os métodos de análise hormonal. A análise de variância foi realizada, com os dados obtidos de cada animal, nas quatro características analisadas, para verificar se houve diferença devido ao efeito do mês (concentrações de progesterona na quimioluminescência e no radioimunoensaio; concentrações de estradiol na quimioluminescência e no radioimunoensaio).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estavam previstas dosagens de 201 amostras de duas fêmeas de cachorro-do-mato-vinagre, porém, nesta análise, 35 amostras (17,41%) não foram utilizadas, durante a etapa de liofilização por não apresentarem perda de umidade adequada para a continuação do experimento. Entretanto, pode-se considerar eficiente o processo de liofilização utilizado, já que apenas algumas amostras não alcançaram, após a liofilização, a perda de umidade necessária para a preparação do extrato fecal. Sendo assim, as dosagens foram realizadas em 166 amostras (80 para a fêmea A e 86 para a fêmea B).

O monitoramento não invasivo de hormônios em extrato fecal mostrou-se eficaz na determinação de estrógenos e progestágenos nas fêmeas da espécie estudada. Desta forma, as concentrações obtidas dos hormônios, a partir do extrato fecal, apesar de evidenciarem variações consideráveis, apresentaram resultados bastante satisfatórios.

1. Variações das concentrações hormonais

Para a fêmea B, as concentrações de progesterona pelo método de quimioluminescência variaram numa faixa de 43,53 a 975,00 ng/g, enquanto que, pelo método de radioimunoensaio, a variação foi de 56,37 a 915,84 ng/g.

No trabalho de DeMatteo e colaboradores (2006), utilizando o método de radioimunoensaio, os intervalos de progestinas fecais observados nas fêmeas estudadas foram de 184 a 3.506,67 ng/g para uma fêmea, de 300 a 1.553 ng/g para outra fêmea, e um intervalo de 730 a 1.400 ng /g para uma terceira fêmea, valores estes mais elevados do que as concentrações obtidas no presente trabalho, analisando duas fêmeas da mesma espécie. Essa grande diferença entre os dois estudos pode ser explicada pelo tempo de armazenamento das amostras do presente trabalho, em que as amostras foram processadas e dosadas após 8 anos

de armazenamento, podendo assim ter sofrido uma deterioração pela metabolização por parte das bactérias presentes que agem diretamente nos metabólitos hormonais.

Analisando as concentrações dos metabólitos fecais de estradiol, foi constatado que estas variaram de 42,59 a 575,12 pg/g de fezes liofilizadas na quimioluminescência. Quanto às concentrações do mesmo hormônio no radioimunoensaio, a variação foi de 4,90 até 39,37 pg/g.

Já as concentrações de progesterona obtidas da fêmea A pelo método de quimioluminescência variaram numa faixa de 39,80 até 812,81 ng/g. Pelo método de radioimunoensaio, foram observadas variações com um intervalo menor, de 44,78 a 858,59 ng/g.

As concentrações dos metabólitos fecais de estradiol variaram de 38,25 a 564,65 pg/g na quimioluminescência. Quanto às concentrações do mesmo hormônio no radioimunoensaio, a variação foi de 2,63 a 72,50 pg/g.

Os gráficos a seguir ilustram as concentrações dos hormônios progesterona e estradiol, dosados pelos métodos de quimioluminescência e radioimunoensaio em cada fêmea (Tab. 3 e 4 – Anexo 1).

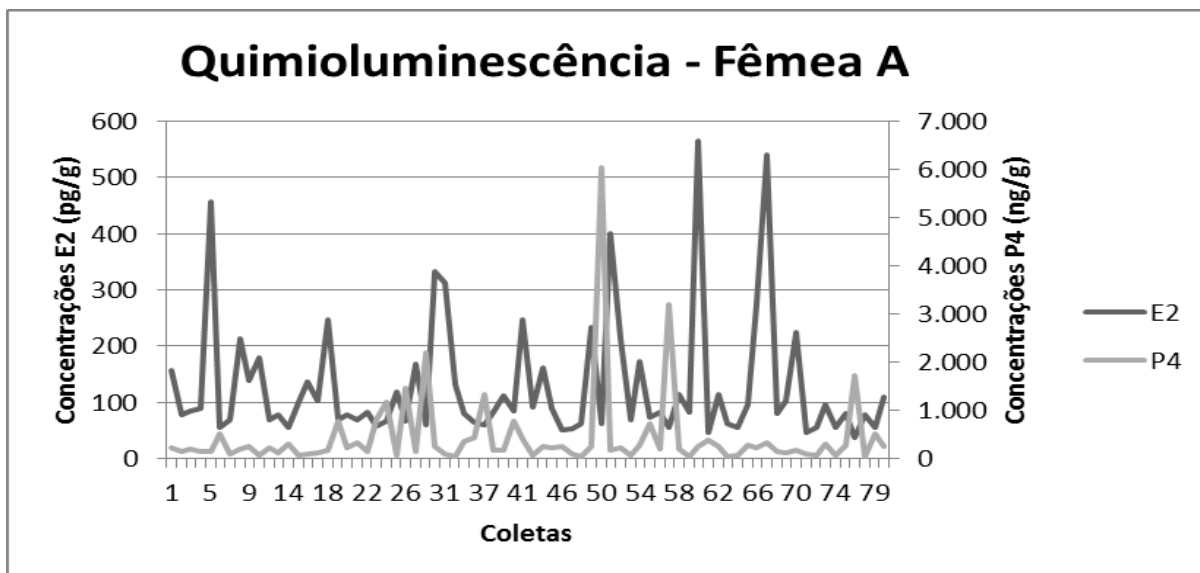


Gráfico 1: Concentrações hormonais de progesterona (P4) e estradiol (E2) encontradas em extratos fecais liofilizados da fêmea A de cachorro-do-mato-vinagre, dosadas pelo método de quimioluminescência, ao longo dos meses de março a dezembro de 2005.

De acordo com o Gráfico 1 da fêmea A, podem ser observadas elevações de estradiol mais pronunciadas nas coletas 5 (abril), 60 (outubro) e 67 (novembro) com concentrações de 457,64; 564,65 e 540,50 pg/g, respectivamente, pelo método de quimioluminescência. Tais elevações podem servir de indícios de que a fêmea A estivesse em uma fase folicular nos momentos em que foram coletadas estas amostras fecais.

Já as concentrações de progesterona da fêmea A neste mesmo método revelam que as maiores taxas foram detectadas nas coletas 50 (setembro) e 57 (outubro), com concentrações de 6.055,28 e 3.200,00 ng/g, respectivamente. Isto pode indicar que, nestes momentos referentes às coletas 50 e 57, a fêmea A poderia estar em uma fase luteal, de acordo com as concentrações de progesterona.

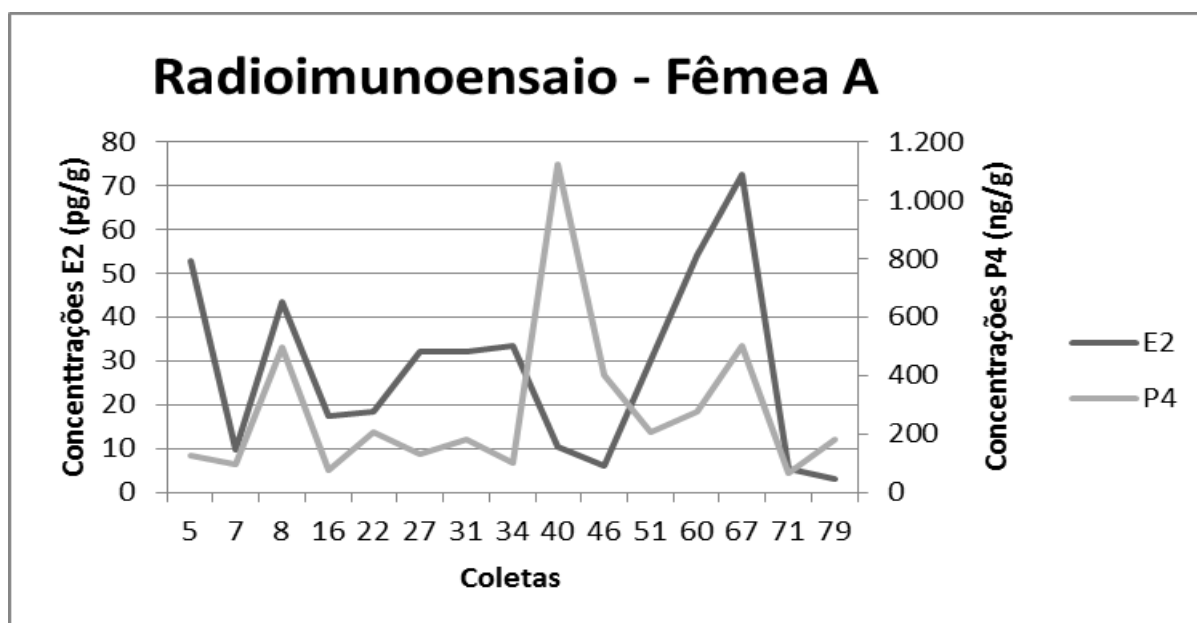


Gráfico 2: Concentrações hormonais de progesterona (P4) e estradiol (E2) encontradas em extratos fecais liofilizados da fêmea A de cachorro-do-mato-vinagre, dosadas pelo método de radioimunoensaio, ao longo dos meses de março a dezembro de 2005.

O Gráfico 2 permite a observação, pelo método de radioimunoensaio, das maiores concentrações de estradiol ocorridas nas coletas 5 (abril), 60 (outubro) e 67 (novembro) com concentrações de 52,96; 54,29 e 72,50 pg/g, respectivamente.

Estas amostras também são as maiores elevações, quando observamos o gráfico da dosagem hormonal pelo método de quimioluminescência (Gráfico 1) na mesma fêmea. Desta forma, ambos os métodos são coincidentes, visto que foram detectadas as maiores concentrações nas mesmas amostras fecais.

Quando as concentrações de progesterona são analisadas a partir do Gráfico 2, é possível perceber que as maiores taxas são relacionadas às coletas de 10 (maio) e 23 (julho) com valores, respectivamente, de 1.125 e 1.108 ng/g. A partir daí, uma comparação com o gráfico anterior (Gráfico 1) pode ser feita, observando que, apesar de ser analisado o mesmo hormônio, na mesma fêmea, as amostras mais concentradas não são as mesmas, uma vez que pelo método de radioimunoensaio não foi obtida a leitura das amostras 50 e 57 (Gráfico1).

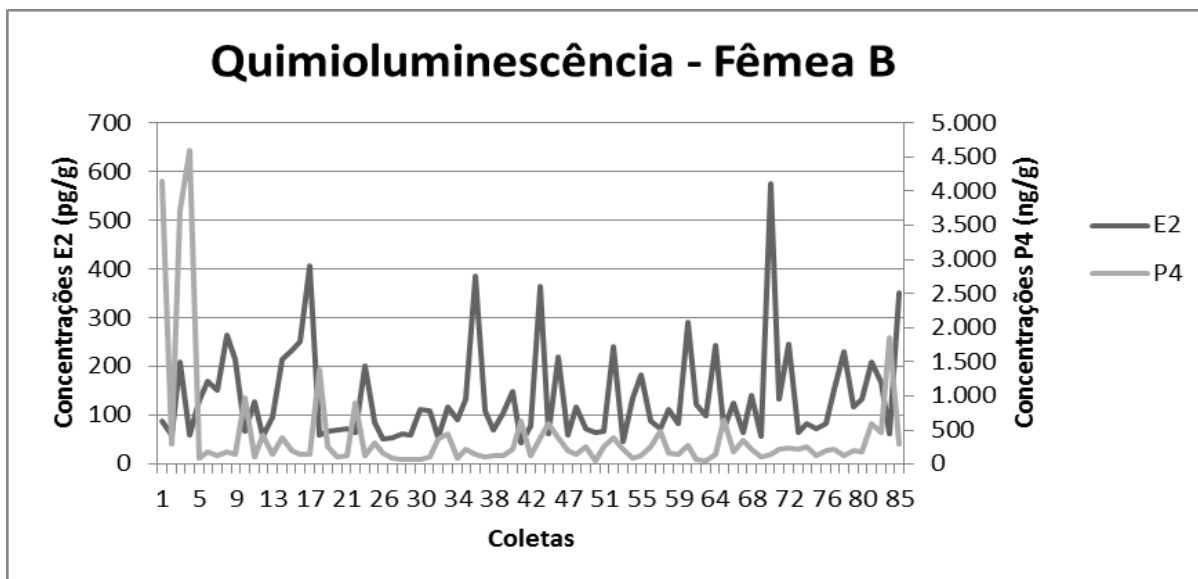


Gráfico 3: Concentrações hormonais de progesterona (P4) e estradiol (E2) encontradas em extratos fecais liofilizados da fêmea B de cachorro-do-mato-vinagre, dosadas pelo método de quimioluminescência, ao longo dos meses de março a dezembro de 2005.

O Gráfico 3 permite a observação das maiores elevações do hormônio estradiol, revelando a ocorrência destas nas coletas 17 (junho), 36 (agosto), 43 (agosto), 70 (novembro) e 85 (dezembro), apresentando as seguintes concentrações, 406,90; 386,11; 365,67; 575,12 e 350,49 pg/g. Desta forma, pode existir a possibilidade de que a fêmea B estivesse apresentando, nestes períodos, episódios de fase folicular.

Para a progesterona, o Gráfico 3 demonstra as maiores concentrações relacionadas às coletas 1 (março), 3 (abril), 4 (abril), 18 (junho) e 84 (dezembro), com os seguintes valores, respectivamente, 4.154,23; 3.718,59; 4.591,58; 1.386,14 e 1.853,23 ng/g. Tais elevações podem indicar uma possível ocorrência de fazer luteal ocorrida nesta fêmea, no referido período.

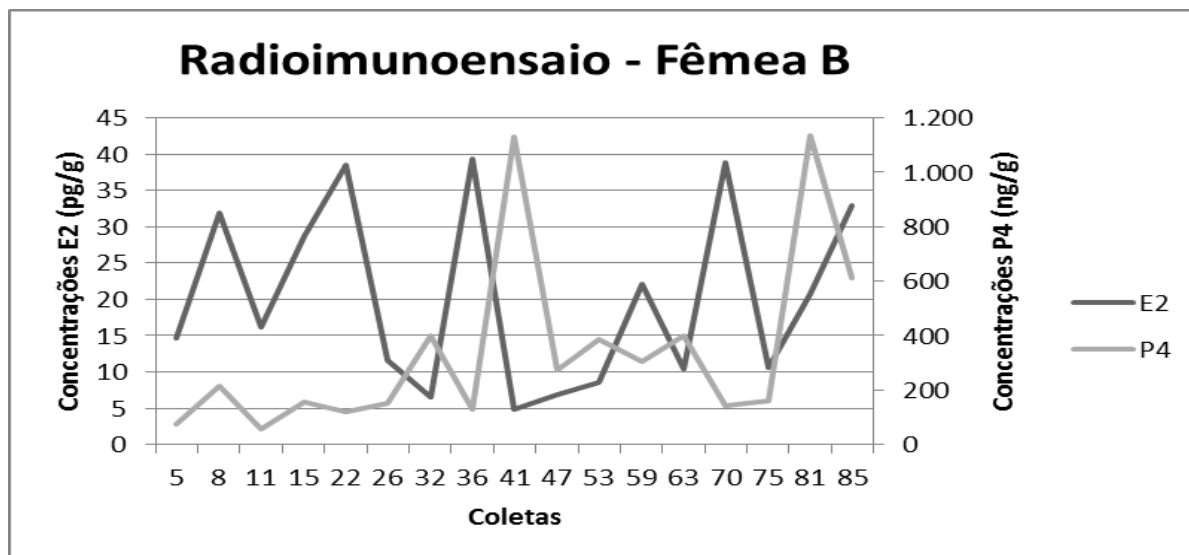


Gráfico 4: Concentrações hormonais de progesterona (P4) e estradiol (E2) encontradas em extratos fecais liofilizados da fêmea B de cachorro-do-mato-vinagre, dosadas pelo método de radioimunoensaio, ao longo dos meses de março a dezembro de 2005.

O Gráfico 4 ilustra as concentrações de estradiol dosadas pelo método de quimioluminescência, revelando que as maiores taxas podem ser observadas nas amostras das coletas 8 (maio), 22 (junho), 36 (agosto), 70 (novembro) e 85 (dezembro), com valores, respectivamente, de 31,86; 38,59; 39,37; 38,78 e 32,93 pg/g.

Quando uma comparação com o Gráfico 3 (dosagem pela quimioluminescência) é feita, pode-se observar que das cinco maiores concentrações ilustradas, três coincidem com o Gráfico 4, sendo estas, as coletas 36 (agosto), 70 (novembro) e 85 (dezembro). Este fato consegue mostrar que ambos os métodos são similares quando comparados.

Ao se analisarem as concentrações de progesterona a partir do Gráfico 4, pode ser notado que as maiores elevações ocorrem nas coletas 23 (julho), 41 (agosto) e 81 (dezembro), com os seguintes valores, respectivamente, 1.130,65; 1.130,65 e 1.136,36 ng/g.

A partir das concentrações de progesterona detectadas em ambos os métodos, pode-se observar que não houve coincidência entre as coletas com maiores concentrações, ilustrados pelos gráficos anteriores (Gráficos 3 e 4). Enquanto que, no método de quimioluminescência, as maiores concentrações ocorreram nas coletas 1, 3, 4 e 18; os maiores valores detectados pelo método de radioimunoensaio ocorreram nas coletas 23, 41 e 81. Este evento pode ser explicado pelo fato de que as coletas de maior concentração na quimioluminescência não obtiveram leitura pelo método de radioimunoensaio.

Em coletas em ambas as fêmeas, que apresentaram as maiores concentrações para progesterona, não ocorreu coincidência, devendo-se ao fato de que não foi detectada leitura pelo radioimunoensaio nas mesmas amostras dosadas pela quimioluminescência.

Pode-se observar que, pelo método de radioimunoensaio, as fêmeas A e B obtiveram uma de suas amostras com maior concentração de progesterona, a coleta 23, feita no mesmo dia (04 de julho) para estas fêmeas. Da mesma forma, analisando as maiores concentrações de estradiol nos dois métodos, em ambas as fêmeas, pode-se observar que as coletas 67 (fêmea A) e 70 (fêmea B) foram coletadas no mesmo dia (09 de novembro). Tais fatos podem ser explicados pelo convívio entre estas, já que as fêmeas A e B dividiam o mesmo recinto.

Observando cada gráfico, pode ser notado que as concentrações hormonais detectadas em cada método de dosagem hormonal são proporcionais, mostrando que as elevações e reduções das taxas dos hormônios são similares tanto pela quimioluminescência, quanto pelo radioimunoensaio.

2. Controle de qualidade

Um controle de qualidade, para o método de radioimunoensaio, foi realizado por meio do coeficiente de variação intraensaio para cada ensaio de progesterona, resultando em 0,16% e 0,70%, diferentemente do que observaram Paz e colaboradores (2009), com coeficiente intraensaio baixo de 2,58% e alto de 6,36%.

No caso do coeficiente de variação interensaio deste mesmo hormônio, no presente estudo, o resultado foi de 0,5%, sendo compatível com Paz e colaboradores (2009), em que o coeficiente interensaio baixo de 0,67% e alto de 5,55%.

Desta forma, o controle de qualidade apresentou-se dentro da porcentagem desejada (até 7%) para verificação da eficiência das dosagens, sendo caracterizado como de boa qualidade.

A sensibilidade mínima detectada para os dois ensaios de progesterona foi 0,01 ng/mL, acima do que Paz e colaboradores (2009) relataram em seu estudo, com mínima de 0,004 ng/mL para progesterona.

Para estradiol, a sensibilidade mínima foi de 0,00014 ng/mL (PAZ *et al.*, 2009), bastante abaixo do observado neste experimento (4 pg/mL).

Para o estradiol, o coeficiente intraensaio foi de 0,7%, valor próximo ao de Paz e colaboradores (2009) que foi baixo de 0,69% e alto de 4,15%.

3. Médias das concentrações hormonais

Foi feita uma avaliação das médias mensais das concentrações dos hormônios dosados em cada método, para cada fêmea, revelando os níveis secretórios médios destes hormônios nas fezes usadas no extrato fecal analisado. Desta forma, pode-se ter uma estimativa da secreção de cada hormônio, relacionando a intensidade com que foi secretado e o período em que ocorreu (Fig. 1 a 4; Tab. 7 a 10 – Anexo 1).

Na fêmea A, foi possível observar que nas médias das concentrações mensais de estradiol, dosadas pela quimioluminescência, ocorreram em quatro momentos, quando as médias mensais se apresentaram com valores maiores do que os das demais médias, nos meses de abril, julho, setembro e novembro (Fig. 1 e Tab. 5). Estas elevações podem indicar que a fêmea A poderia estar numa fase folicular.

No perfil da progesterona, as médias mensais mostram que junho e agosto são os meses que apresentaram as maiores médias hormonais para esta fêmea, revelando uma provável atividade luteínica neste período (Fig. 1 e Tab. 5).

Quanto às dosagens pelo radioimunoensaio nesta fêmea (Fig. 2 e Tab. 6), foram identificadas três médias mensais das concentrações de estradiol maiores do que as dos demais meses, ocorridas em maio, julho e novembro. Comparando com as maiores médias na quimioluminescência (Fig. 1 e Tab. 5), somente uma das médias (novembro) coincide com a ocorrida no radioimunoensaio.

Observando as médias de progesterona (Fig. 2 e Tab. 6), três médias se destacam por serem as mais elevadas, nos meses de maio, agosto e outubro, podendo indicar uma possível atividade luteínica mais representativa neste período. Ao serem comparadas com a dosagem pela quimioluminescência (Fig. 1 e Tab. 5), somente uma das maiores médias mensais (agosto) foi coincidente.

Na Figura 3 (Tab. 7), pode-se observar que, na dosagem hormonal pela quimioluminescência com a fêmea B, ocorreram três momentos (junho, agosto e novembro) em que as médias das concentrações mensais de estradiol apresentaram uma maior elevação em relação às demais médias ao longo da coleta, o que demonstra que esta fêmea poderia estar em uma fase de crescimento folicular nestes episódios.

De acordo com as médias das concentrações de progesterona (Fig. 3 e Tab. 7), os meses de maio e dezembro obtiveram as maiores médias. Tais eventos podem indicar que esta fêmea tenha tido um período de atividade luteínica nestes meses.

Na Figura 4 (Tab. 8), as médias das concentrações mensais de estradiol da fêmea B, ainda pelo radioimunoensaio, revelaram que, nos meses de maio, junho, novembro e dezembro, as maiores médias foram detectadas em relação às demais médias. Quando se comparam as médias com a quimioluminescência (Fig. 3 e Tab. 7), pode-se observar que somente no mês de dezembro as maiores médias não são coincidentes, revelando que ambos os métodos são similares quanto à identificação

das concentrações hormonais.

Pode ser observado ainda nesta figura (Fig. 4 e Tab. 8) que existem três elevações nas concentrações de progesterona nos meses de maio, outubro e novembro, enquanto as elevações deste hormônio pela quimioluminescência (Fig. 3 e Tab. 7) ocorreram nos meses de maio e dezembro, coincidindo somente no mês de maio.

4. Sazonalidade e dominância

A partir do Gráfico 5, pode-se observar que as maiores médias das concentrações mensais de estradiol da fêmea A, pela quimioluminescência, são seguidas das maiores médias da fêmea B. No mês de abril, foi identificada uma das médias mais elevadas da fêmea A, sendo seguida no mês posterior (maio), por uma das maiores médias da fêmea B. Esta dinâmica permanece, praticamente, por todas as médias de ambas as fêmeas, não somente nas elevações, já que, quando ocorre uma média mais elevada na fêmea A, nota-se a redução da média na fêmea B.

Este cenário também pode ser observado quanto às médias de progesterona (Gráf. 5) pelo mesmo método de quimioluminescência, levando-se à hipótese de que uma fêmea pode exercer certa dominância sobre a outra. Somente a partir do mês de outubro que este padrão cessa. Porém, se faz necessária a retirada de uma das fêmeas do convívio da outra para que se verifique a existência desta provável dominância entre estas.

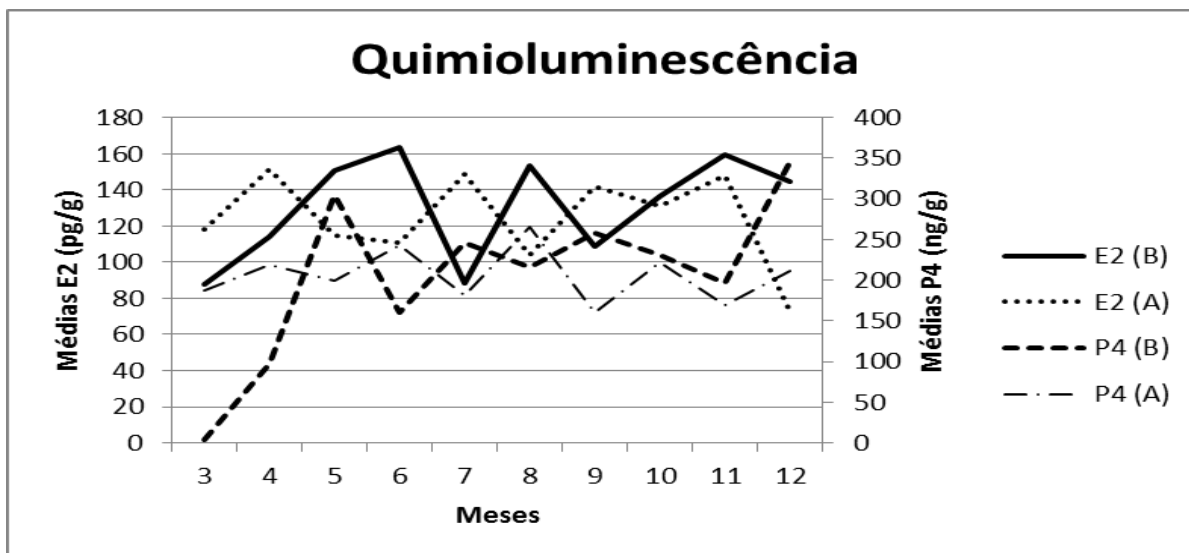


Gráfico 5: Médias de estradiol (E2) e progesterona (P4) encontradas em extratos fecais liofilizados das fêmeas A e B de cachorro-do-mato-vinagre dosados segundo os meses de coleta de amostras pelo método de quimioluminescência.

A mesma dinâmica se confirma quando a dosagem de estradiol nas amostras é feita pelo método de radioimunoensaio, pelo menos até o mês de agosto, retomando em novembro e dezembro (Gráf. 6).

Analisando as médias das concentrações mensais da progesterona (Gráf. 6), pode-se notar que este mesmo efeito é observado a partir do mês de julho até dezembro, com as elevações das médias da fêmea A, sendo seguidas pelas elevações das médias da fêmea B no mês posterior.

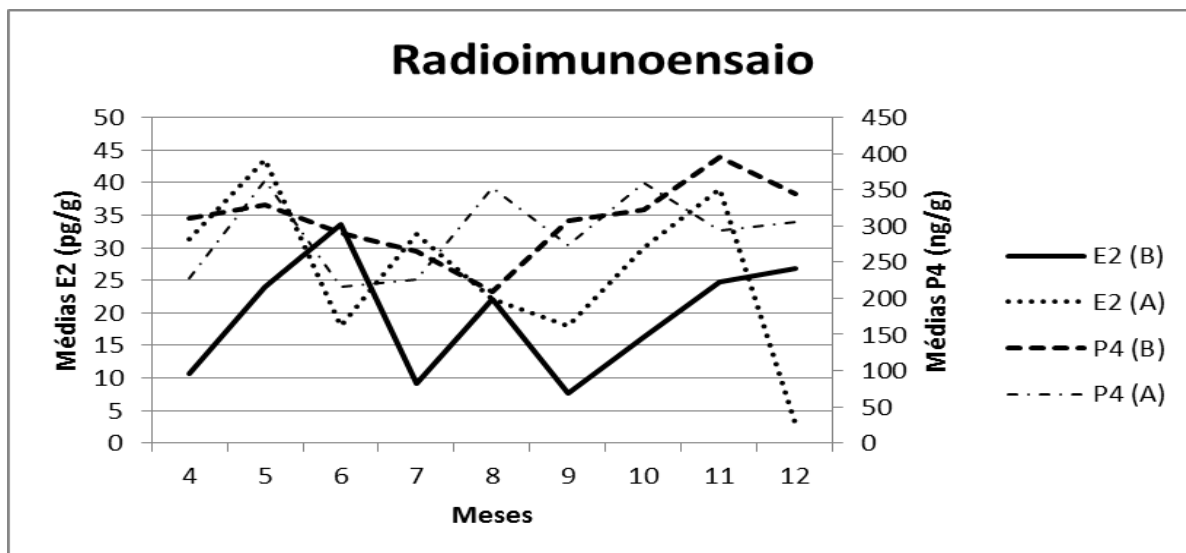


Gráfico 6: Médias de estradiol (E2) e progesterona (P4) encontradas em extratos fecais liofilizados das fêmeas A e B de cachorro-do-mato-vinagre dosados segundo os meses de coleta de amostras pelo método de radioimunoensaio.

Para detectar se existe uma sincronização entre as fêmeas que viviam em um mesmo recinto, é preciso que se aumente o período de coleta das amostras fecais por mais de 1 ano, além de executar estas dosagens também com as fêmeas vivendo em recintos diferentes.

Segundo Rao e Whittaker (1996), no caso de cachorros-do-mato-vinagre, mantidos em cativeiro, somente a fêmea do casal alfa copula e esta fêmea dominante suprime o cio das fêmeas subordinadas.

Pesquisas observando o comportamento reprodutivo mostraram que cachorros-do-mato-vinagre em cativeiro, considerando várias condições ambientais, não têm uma época específica de reprodução anual como visto em canídeos de latitudes temperadas. Acasalamentos e nascimentos ocorrem ao longo do ano, contribuindo para a hipótese de espécie sem sazonalidade (KLEIMAN, 1968; PORTON *et al.*, 1987).

Para Nowak (1999), o padrão reprodutivo do cachorro-do-mato-vinagre é tido como não sazonal, ininterrupto e, em parte, influenciado por fatores sociais, com

estros e nascimentos ocorrendo ao longo de todo o ano e ainda com algumas fêmeas identificadas como poliétricas.

Cazes (2004) diz que a regularidade de nascimentos ao longo do ano pode ser devido às condições constantes de alimentação e temperatura estabelecida em cativeiro, sem que haja a necessidade de um manejo reprodutivo para que os nascimentos ocorram em períodos favoráveis, diferentemente de outros canídeos selvagens que mantêm o padrão reprodutivo sazonal independente de estarem em cativeiro, como descrito por Beisiegel e Ades (2002).

Cazes (2004) ainda afirma que não foi possível chegar a uma conclusão quanto à existência de períodos reprodutivos específicos para o cachorro-do-mato-vinagre.

Pelo presente estudo, não se pode afirmar se existe um padrão de sazonalidade sem que haja um programa de coletas de amostras com um período mais extenso, comparando, durante pelo menos 2 anos inteiros, e um acompanhamento dos mesmos animais para identificar o padrão hormonal.

Monfort (2003) sugeriu, em seu trabalho, que seja conduzida uma análise do extrato fecal por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Performance - *High Performance Liquid Chromatography*) para a identificação dos metabólitos presentes nas fezes da espécie estudada, permitindo a utilização de uma metodologia de dosagem desses metabólitos que seja mais eficiente para estes animais.

A HPLC vem sendo utilizada como técnica de apoio às técnicas imunométricas, permitindo a separação dos principais compostos para direcionar a escolha dos anticorpos para posterior quantificação por radioimunoensaio e quimioluminescência, por exemplo (DEHNHARD *et al.*, 2003; WASSER *et al.*, 2000; BROWN *et al.*, 1994). Brown e colaboradores (1996), em seus ensaios com felídeos, utilizaram HPLC para determinar o número e a proporção relativa de metabólitos da testosterona nas fezes e na urina de gatos.

5. Correlação entre os métodos de dosagem hormonal

A correlação entre os métodos foi positiva e de alta magnitude, isto é, daria o mesmo resultado executar a análise hormonal utilizando tanto a quimioluminescência quanto o radioimunoensaio para a dosagem hormonal. Por isso, a eleição do método de dosagem de hormônios do extrato fecal estaria atrelada a diversos fatores como, por exemplo, o custo do *kit* utilizado para medir as concentrações dos hormônios, a disponibilidade do aparelho, ou mesmo o preparo das amostras para executar as dosagens, como o procedimento de extração das amostras.

Tabela 9: Correlação entre os métodos de radioimunoensaio e quimioluminescência de dosagem hormonal:

| | P4 Qui | E2 Qui |
|---------------|---------------|---------------|
| P4 RIE | 0,83 | - |
| E2 RIE | - | 0,90 |

6. Análise Estatística

Entre os animais e entre as coletas, não existe diferença significativa ($P > 0,05$). No que se refere à correlação entre os métodos de análise hormonal, foi verificado que apresentam alta correlação, demonstrando que não existe diferença significativa entre estes ($P > 0,05$).

As correlações entre os métodos de alta magnitude são significativas para a execução da dosagem hormonal, isto é, o resultado da análise hormonal é o mesmo, independentemente do método, a quimioluminescência ou o radioimunoensaio. Por isso, de acordo com os resultados estatísticos, a eleição do método de dosagem de hormônios do extrato fecal estaria atrelada a diversos fatores como, por exemplo, a disponibilidade do aparelho, a metodologia de preparo das amostras para a execução das dosagens, o procedimento de extração das amostras ou mesmo o

custo do conjunto comercial usado para medir as concentrações dos hormônios (Tab. 10 - Anexo 1).

CONCLUSÃO

O processo de liofilização utilizado mostrou-se eficiente, permitindo a secagem adequada das amostras fecais coletadas das duas fêmeas de cachorro-do-mato-vinagre, para que a dosagem hormonal destas amostras liofilizadas obtivesse os resultados satisfatórios, os quais foram apresentados.

Diante dos resultados encontrados pela dosagem hormonal a partir de metabólitos fecais, não foram observadas variações significativas entre as características observadas neste estudo, como a correlação entre os métodos utilizados, as duas fêmeas descritas e os hormônios.

Os métodos aplicados para a dosagem hormonal permitiram a verificação da ocorrência de um padrão cíclico entre estas fêmeas de cachorro-do-mato-vinagre, já que ambos forneceram, como resultados, concentrações suficientes para sugerir um ciclo estral nesta espécie.

Em conclusão, apesar de terem sido utilizados conjuntos diagnósticos comerciais específicos para dosagem hormonal em humanos, o presente estudo sugere a adequação dos métodos de quimioluminescência e radioimunoensaio para a quantificação dos metabólitos fecais de estradiol e progesterona na espécie *Speothos venaticus*, incluindo HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Performance - *High Performance Liquid Chromatography*), a fim de que se faça um estudo mais apurado dos metabólitos hormonais presentes no extrato fecal.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AMBIENTE BRASIL. **Cachorro-do-mato-vinagre (*Speothos venaticus*)**. Disponível em: <[http://ambientes.ambientebrasil.com.br/fauna/mamiferos/cachorro-do-mato-vinagre_\(speothos_venaticus\).html](http://ambientes.ambientebrasil.com.br/fauna/mamiferos/cachorro-do-mato-vinagre_(speothos_venaticus).html)>. Acesso em: nov. 2012.

BAKER, A. J.; BAKER, A. M.; THOMPSON, K. V. **Parental Care Captivity Mammals**. *Wild mammals in captivity: Principles and techniques*. The University of Chicago Press. p. 497-512, EUA, 1996.

BEISIEGEL, B. M.; ADES, C. **The behavior of the bush dog (*Speothos venaticus* Lund, 1842) in the field: A review**. *Revista de Etologia*. v. 4, p. 17-23, 2002.

BROWN, J. L.; WASSER, S. K.; WILDT, D. E.; GRAHAM, L. H. **Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured noninvasively in feces**. *Biology of Reproduction* v. 51, p. 776-786, 1994.

BROWN, J. L.; WILDT, D. E.; WIELBNOWSKI, N.; GOODROWE, K. L.; GRAHAM, L. H.; WELLS, S.; HOWARD, J. G. **Reproductive activity in captive female cheetahs (*Acinonyx jubatus*) assessed by faecal steroids**. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 106, p. 337-346, 1996.

BROWN, J. L.; WILDT, D. **Assessing reproductive status in wild felids by non-invasive faecal steroid monitoring**. *International Zoo*, v. 35, p. 173-191, 1997.

CAZES, L. B. **Análise dos eventos reprodutivos do *Speothos venaticus* (LUND, 1842) (Carnivora: canidae) (cachorro-do-mato-vinagre) em cativeiro**. Monografia UENF – Rio de Janeiro. 2004.

CHELINI, M. O. M. **Estudo comparativo de protocolos de extração de hormônios esteroides fecais em diferentes espécies de animais**. Dissertação de Mestrado USP - São Paulo, 2006.

CRFRN - Conselho Regional de Farmácia do Rio Grande do Norte. **Técnicas imunológicas e ensaios hormonais**. Disponível em: <<http://www.crfrn.org.br/downloads/sesap/imuno.pdf>>. Acesso em: jan. 2013.

CRUVINEL, W. M. **Quimioluminescência**. Universidade Católica de Goiás. Disponível em: <http://www2.ucg.br/cbb/professores/49/Biomedicina/6_periodo/Quimioluminescencia.pdf>. Acesso em: jan. 2013.

DEMATTEO, K. E.; PORTON, I. J.; KLEIMAN, D. G.; ASA, C. S. **The effect of the male bush dog (*Speothos venaticus*) on the female reproductive cycle**. *Journal of Mammalogy*, v. 87(4), p. 723–732, 2006.

DEMATTEO, K.; MICHALSKI, F.; LEITE-PITMAN, M. R. P. ***Speothos venaticus***. In: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Versão 2011.2. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: nov. 2012.

DE OLIVEIRA, T. G.; DALPONTE, J. C. ***Speothos venaticus* (Lund, 1892)**. In: MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. (eds). Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. V. II. 1. ed. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, p. 783-784, 2008. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/lista-especies/744-cachorro-do-mato-vinagre>>. Acesso: em nov. 2012.

DE OLIVEIRA, T. G. **Distribution, habitat utilization and conservation of the vulnerable bush dog *Speothos venaticus* in northern Brazil**. *Oryx – The International Journal of Conservation*, v. 43, p. 247-253, 2009.

DEHNHARD, M.; CLAUSS, M.; LECHNER-DOLL, M.; MEYER, H. H. D.; PALME, R. **Noninvasive monitoring of adrenocortical activity in roe deer (*Capreolus capreolus*) by measurement of fecal cortisol metabolites**. *Gen. Comp. Endocrinol.* v. 123, p. 111–120, 2001.

DEHNHARD, M.; SCHREER, A.; KRONE, O.; JEWGENOW, K.; KRAUSE, M.; GROSSMANN, R. **Measurement of plasma corticosterone and fecal glucocorticoid metabolites in the chicken (*Gallus domesticus*), the great cormorant (*Phalacrocorax carbo*), and the goshawk (*Accipiter gentilis*)**. *General and Comparative Endocrinology*, v. 131, p. 345–352, 2003.

DMOCH, R. **Protocolo de manejo e studbook regional do cachorro-do-mato-vinagre (*Speothos venaticus*)**. RIOZOO, Rio de Janeiro-RJ, 2000.

DRUWA, P. **The social behavior of the bush dog (*Speothos*)**. *Carnivore*, v. 6, p. 46–71, 1983.

GOOD, T.; KHAN, M. Z.; LYNCH, J. W. **Biochemical and physiological validation of a corticosteroid radioimmunoassay for plasma and fecal samples in oldfield mice (*Peromyscus polionotus*)**. *Physiology & Behavior*, v. 80, p. 405-411, 2003.

GRAHAM, L.; SCHWARZENBERGER, F.; MÖSTL, E.; GALAMA, W.; SAVAGE, A. **A versatile enzyme immunoassay for the determination of progestogens in feces and serum**. *Zoo Biol*, v. 20, 1995.

GUEDES, M. T. B. **Radioimunoensaio (RIA)**. Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, 2010. Disponível em: <<http://www.slideshare.net/labimuno/radioimunoensaio-3540380>>. Acesso em: fev. 2013.

HARPER, J. M.; AUSTAD, S. N. **Fecal Glucocorticoids: A Noninvasive Method of Measuring Adrenal Activity in Wild and Captive Rodents**. *Physiological and Biochemical Zoology*, v. 73, p. 12-22, 2000

JOHNSON, L. M.; GAY, V. L. **Luteinizing hormone in the cat. II. Mating-induced secretion**. *Endocrinology*, v. 109 (1), p. 247-252, 1981.

KITCHENER, S. L. **Observations on the breeding of the bush dog (*Speothos venaticus*) at the Lincoln Park Zoo, Chicago**. *International Zoo Yearbook*, v. 11, p. 99-101, 1971.

KLEIMAN, D. G. **Reproduction in the Canidae**. *International Zoo Yearbook*, v. 8, p. 3-8, 1968.

KLEIMAN, D. G. **Social behavior of Maned Wolf (*Chrysocyon brachyurus*) at and the Bush Dog (*Speothos venaticus*): a study in contrast**. *Journal of Mammalogy*, v. 53, p. 791-806, 1972.

KORNDÖRFER, C. M.; MEIRELLES, C. F.; BUENO, I. C. S.; ABDALLA, A. L. **Métodos de extração para determinação de progesterona em fezes de coelho (*Oryctolagus cuniculus*) através de radioimunoensaio**. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* v. 35, n. 3, 1998.

LABORATÓRIO DE FARMÁCIA NUCLEAR. **Radioatividade**. Faculdade de Farmácia - UFMG. Disponível em: <<http://www.farmacia.ufmg.br/nuclear/radioatividade.htm>>. Acesso em: fev. 2013.

LUNDBERG, U. **Stress hormones in health and illness: The roles of work and gender**. *Psychoneuroendocrinology*, v. 30, p. 1017–1021, 2005.

MACHADO, L. H. A. **Estudo do hiperparatireoidismo secundário à insuficiência renal crônica em cães**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2000.

MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**. 1.ed. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente; Belo Horizonte, MG: Fundação Biodiversitas, 1420p, 2008.

MACDONALD, D. W. **Social behaviour of captive bush dogs (*Speothos venaticus*)**. *Journal of Zoology (London)*, v. 239, p. 525–543, 1996.

MCKENZIE, S.; DEANE, E. M. **Faecal corticosteroid levels as an indicator of well-being in the tammar wallaby, *Macropus eugenii***. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, v. 140, p. 81–87, 2005.

MICHALSKI, F.; PERES, C. A. **Anthropogenic determinants of primate and carnivore local extinctions in a fragmented forest landscape of southern Amazonia**. *Biological Conservation*, v. 124, p. 383-396, 2005.

MONFORT, S. L. **Non-invasive endocrine measures of reproduction and stress in wild population**. In: HOLT, W. V.; PICKARD, A. R.; RODGER, J. C.; WILD, D. E. (Eds). *Reproductive Science and integrated Conservation*, Cambridge: Cambridge University Press, p. 146-165, 2003.

NOWAK, R. M. **Walker's Mammals of the World – 6. ed., v.1 e 2**, The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London, p. 632-678, 1999.

PAZ, R. C. R.; ADANIA, C. H.; OLIVEIRA, C. A.; BARNABE, R. C. **Validação de conjuntos diagnósticos comerciais para dosagem sérica de progesterona e estradiol em jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*)**. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, v. 46, n. 3, p. 237-244, 2009.

PORTON, I. **Bush dog urine-marking: its role in pair formation and maintenance**. *Animal Behaviour*, v. 31, p. 1061–1069, 1983.

PORTON, I. J., KLEIMAN, D. G.; RODDEN, M. **Seasonality of bush dog reproduction and the influence of social factors on the estrous cycle.** *Journal of Mammalogy*, v. 68, p. 867–871, 1987.

RAO, S. J.; WHITTAKER, T. **Problems in hand-rearing a single Bush Dog** *International Zoo News*, v.43(4), p. 222-227, 1996.

REBOUÇAS, M. F. **Imunoquimioluminescência.** Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde - ICS. Departamento de Biointeração. 2010. Disponível em: <<http://www.slideshare.net/labimuno/quimioluminescencia-3540384>>. Acesso em: mar. 2013.

RECHE JUNIOR, A. **Avaliação da corticosterona fecal em gatos domésticos (*Felix catus*) que vivem em colônias e isolamento.** Biblioteca virtual – FAPESP. Disponível em: <<http://www.bv.fapesp.br/pt/auxilios/25630/avaliacao-corticosterona-fecal-gatos-domesticos/>>. Acesso em: mai. 2013.

SAS INSTITUTE INC. JMP 3.2.2. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, 1996.

SCHWARZENBERGER, F. **The many uses of non-invasive faecal steroid monitoring in zoo and wildlife species.** *International Zoo Yearby*, v. 41, p. 52-74, 2007.

SCHWARZENBERGER, F.; MÖSTL, E.; BAMBERG, E.; PAMMER, J.; SCHMEHLIK, O. **Concentrations of progestagens and oestrogens in faeces of pregnant Lipizzan, trotter and thoroughbred mares.** *J. Reprod. Fertil Suppl.*, v. 44, p. 489-499, 1991.

SNYDER, N. F. R.; DERRICKSON, S. R.; BEISSINGER, S. R.; WILEY, J. M.; SMITH, T. B.; TONE, W. D. **Limitations of captive breeding in endangered species recovery.** *Conservation Biol.*, v. 10(2), p. 338-48, 1996.

SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Dukes Fisiologia dos Animais Domésticos.** 11^a ed. Rio de Janeiro, RJ, Editora: Guanabara Koogan, cap. 38, p. 636, 1996

VIAU, P.; FELIPPE, E. C. G.; DE OLIVEIRA, C. A. **Quantificação de esteroides fecais de fêmeas de onça-pintada (*Panthera onca*) mantidas em cativeiro: validação da técnica.** *Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science*. São Paulo. v. 42, n. 4, p. 267-275, 2005.

WASSER, S. K.; HUNT, K. E.; BROWN, J. L.; COOPER, K.; CROCKETT, C. M.; BECHERT, U.; MILLSPAUGH, J. J.; LARSON, S.; MONFORT, S. L. **A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species.** Gen. Comp. Endocrinol., n. 120, p. 260–275, 2000.

WASSER, S. K.; HUNT, K. E.; CLARKE, C. M. **Assessing Stress and Population Genetics Through Noninvasive Means.** In: **Conservation Medicine - Ecological Health in Practice** Oxford University Press, cap. 11, p. 131-144, 2002.

WIELEBNOWSKI, N. C.; FLETCHALL, N.; CARLSTEAD, K.; BUSSO, J. M.; BROWN, J. L. **Noninvasive assessment of adrenal activity associated with husbandry and behavioral factors in the North American clouded leopard population.** Zoo Biology, v. 21, n. 1, p. 77-98, 2002.

WINGFIELD, J. C. **Modulation of the adrenocortical response to stress in birds.** In: DAVEY, K.G. *et al.* (Ed.) **Perspectives in Comparative Endocrinology**, National Research Council, p. 520-528, 1994.

ZUERCHER, G. L.; GIPSON, P. S.; CARRILLO, O. **Diet and habitat associations of bush dogs *Speothos venaticus* in the Interior Atlantic Forest of eastern Paraguay.** Oryx, v. 39, art. 1, p. 86-89, 2005.

ANEXO 1

Tabelas

Tabela 3: Comparação das concentrações de E2 (pg/g) e P4 (ng/g) nos extratos fecais liofilizados da fêmea A de cachorro-do-mato-vinagre, dosados pelos métodos de quimioluminescência e radioimunoensaio, ao longo do ano de 2005.

| Fêmea A Coleta | Concentrações E2 (pg/g) | | Concentrações P4 (ng/g) | | Fêmea A Coleta | Concentrações E2 (pg/g) | | Concentrações P4 (ng/g) | |
|-------------------|-------------------------|-------|-------------------------|----------|-------------------|-------------------------|-------|-------------------------|--------|
| | Quimiol. | RIE | Quimiol. | RIE | | Quimiol. | RIE | Quimiol. | RIE |
| 1 | 156,75 | . | 225,00 | 312,50 | 41 | 247,28 | . | 408,42 | 730,20 |
| 2 | 79,15 | . | 150,75 | 168,34 | 42 | . | . | 123,75 | 142,50 |
| 3 | 85,43 | . | 188,44 | 206,03 | 43 | 92,36 | . | 75,12 | 118,23 |
| 4 | 88,94 | . | 138,19 | 87,94 | 44 | 162,50 | . | 257,35 | 490,20 |
| 5 | 457,64 | 52,96 | 147,78 | 128,08 | 45 | 88,55 | . | 221,67 | 216,75 |
| 6 | 55,72 | . | 509,95 | 621,89 | 46 | 51,13 | 6,13 | 250,00 | 400,00 |
| 7 | 68,16 | 9,58 | 108,21 | 94,53 | 47 | 52,49 | . | 92,04 | 44,78 |
| 8 | 212,94 | 43,53 | 199,00 | 497,51 | 48 | 61,69 | . | 39,80 | 64,68 |
| 9 | 138,42 | . | 258,62 | 837,44 | 49 | 234,90 | . | 247,52 | 618,81 |
| 10 | 68,25 | . | . | 1.125,00 | 50 | 61,31 | . | 6.055,28 | . |
| 11 | 179,25 | . | 75,00 | 130,00 | 51 | 400,50 | 30,00 | 187,50 | 205,00 |
| 12 | 68,56 | . | 235,15 | 495,05 | 52 | 212,75 | . | 220,59 | 306,37 |
| 13 | 79,02 | . | 125,63 | 77,89 | 53 | 69,75 | . | 78,75 | 72,50 |
| 14 | 56,50 | . | 300,00 | 500,00 | 54 | 172,03 | . | 272,28 | 396,04 |
| 15 | 101,00 | . | 79,60 | 67,16 | 55 | 72,99 | . | 716,08 | 653,27 |
| 16 | 137,88 | 17,50 | 105,00 | 77,50 | 56 | 83,09 | . | 196,08 | 392,16 |
| 17 | 103,81 | . | 126,90 | 279,19 | 57 | 56,25 | 5,63 | 3.200,00 | . |
| 18 | 246,25 | . | 162,50 | 155,00 | 58 | 113,38 | . | 189,39 | 222,22 |
| 19 | 69,58 | . | 768,07 | . | 59 | 83,58 | . | 53,48 | 44,78 |
| 20 | 77,64 | . | 226,13 | 183,42 | 60 | 564,65 | 54,29 | 252,53 | 277,78 |
| 21 | 68,75 | . | 337,50 | 550,00 | 61 | 46,29 | . | 383,66 | 730,20 |
| 22 | 83,58 | 18,41 | 136,82 | 203,98 | 62 | 115,25 | . | 250,00 | 737,50 |
| 23 | 58,87 | . | 812,81 | 1.108,37 | 63 | 63,25 | . | 41,25 | 72,50 |
| 24 | 67,75 | . | 1.175,00 | . | 64 | 54,77 | . | 66,58 | 62,81 |
| 25 | 119,85 | . | 81,66 | 110,55 | 65 | 95,23 | . | 276,38 | 778,89 |
| 26 | 67,91 | . | 1.467,66 | . | 66 | 277,61 | . | 223,88 | 310,95 |
| 27 | 168,32 | 32,18 | 136,14 | 128,71 | 67 | 540,50 | 72,50 | 337,50 | 500,00 |
| 28 | 61,06 | . | 2.211,06 | . | 68 | 81,44 | . | 136,14 | 180,69 |
| 29 | 332,75 | . | 250,00 | 312,50 | 69 | 101,96 | . | 117,65 | 117,65 |
| 30 | . | . | 238,69 | 628,14 | 70 | 225,25 | . | 173,27 | 247,52 |
| 31 | 312,32 | 32,02 | 103,45 | 179,80 | 71 | 46,13 | 5,38 | 90,00 | 67,50 |
| 32 | 68,66 | . | . | . | 72 | 55,00 | . | 75,00 | 142,50 |
| 33 | 132,75 | . | 55,00 | 45,00 | 73 | 96,00 | . | 300,00 | 775,00 |
| 34 | . | 33,58 | 120,65 | 101,99 | 74 | 55,25 | . | 62,50 | 47,50 |
| 35 | 80,56 | . | 353,54 | 858,59 | 75 | 81,16 | . | 276,38 | 351,76 |
| 36 | 64,50 | . | 450,00 | 850,00 | 76 | 38,25 | 2,63 | 1.737,50 | . |
| 37 | 60,64 | . | 1.336,63 | . | 77 | 78,61 | . | 48,51 | 119,40 |
| 38 | 83,75 | . | 187,50 | 182,50 | 78 | . | . | 175,00 | 250,00 |
| 39 | 111,88 | . | 173,27 | 272,28 | 79 | 56,63 | 3,08 | 512,50 | 182,50 |
| 40 | 83,88 | 10,50 | 787,50 | 1.125,00 | 80 | 110,30 | . | 251,26 | 628,14 |

Tabela 4: Comparação das concentrações de E2 (pg/g) e P4 (ng/g) nos extratos fecais liofilizados da fêmea B de cachorro-do-mato-vinagre, dosados pelos métodos de quimioluminescência e radioimunoensaio, ao longo do ano de 2005.

| Fêmea B Coleta | Concentrações E2 (pg/g) | | Concentrações P4 (ng/g) | | Fêmea B Coleta | Concentrações E2 (pg/g) | | Concentrações P4 (ng/g) | |
|-------------------|-------------------------|-----------|-------------------------|----------|-------------------|-------------------------|-----------|-------------------------|----------|
| | Quimiol. | RIE | Quimiol. | RIE | | Quimiol. | RIE | Quimiol. | RIE |
| 1 | 87,56 | . | 4.154,23 | . | 44 | 63,25 | . | 587,50 | . |
| 2 | 60,40 | . | 284,65 | 544,55 | 45 | . | . | 236,32 | 273,63 |
| 3 | 209,05 | . | 3.718,59 | . | 46 | 219,55 | . | 383,66 | 495,05 |
| 4 | 58,79 | 6.683,17 | 4.591,58 | . | 47 | 59,65 | 6.930,69 | 198,02 | 272,28 |
| 5 | 129,56 | 14.655,17 | 96,06 | 76,35 | 48 | 117,24 | . | 147,78 | 86,21 |
| 6 | 169,25 | . | 187,50 | 275,00 | 49 | 71,50 | . | 262,50 | 400,00 |
| 7 | 152,21 | . | 122,55 | 164,22 | 50 | 65,25 | . | 58,75 | 95,00 |
| 8 | 265,20 | 31.862,75 | 183,82 | 215,69 | 51 | 67,50 | . | 262,50 | 475,00 |
| 9 | 216,08 | . | 138,19 | 206,03 | 52 | 239,90 | . | 394,09 | 492,61 |
| 10 | 67,25 | . | 975,00 | 775,00 | 53 | 45,15 | 8.495,15 | 218,45 | 388,35 |
| 11 | 127,70 | 16.176,47 | 100,49 | 56,37 | 54 | 135,89 | . | 91,58 | 94,06 |
| 12 | 55,64 | . | 428,92 | 612,75 | 55 | 184,58 | . | 124,38 | 154,23 |
| 13 | 97,30 | . | 147,06 | 215,69 | 56 | 89,00 | . | 262,50 | 737,50 |
| 14 | 214,75 | . | 387,50 | 737,50 | 57 | 71,64 | . | 472,64 | 771,14 |
| 15 | 233,25 | 28.750,00 | 200,00 | 155,00 | 58 | 113,00 | . | 162,50 | 167,50 |
| 16 | 251,24 | . | 136,82 | 310,95 | 59 | 83,98 | 22.087,38 | 145,63 | 303,40 |
| 17 | 406,90 | . | 135,47 | 246,31 | 60 | 291,79 | . | 273,63 | 348,26 |
| 18 | 60,64 | . | 1.386,14 | . | 61 | 122,64 | . | 59,70 | 109,45 |
| 19 | 66,17 | . | 248,76 | 497,51 | 62 | 100,00 | . | 43,53 | 67,16 |
| 20 | 68,84 | . | 114,32 | 120,60 | 63 | . | 10.500,00 | 237,50 | 400,00 |
| 21 | 73,76 | . | 116,34 | 217,82 | 64 | 244,00 | . | 150,00 | 182,50 |
| 22 | . | 38.589,11 | 116,34 | 118,81 | 65 | 73,25 | . | 650,00 | . |
| 23 | 63,57 | . | 904,52 | 1.130,65 | 66 | 125,38 | . | 188,44 | 314,07 |
| 24 | 200,74 | . | 122,52 | 153,47 | 67 | 65,37 | . | 341,46 | 304,88 |
| 25 | 85,43 | . | 314,07 | 741,21 | 68 | 142,12 | . | 209,36 | 492,61 |
| 26 | 50,49 | 11.642,16 | 159,31 | 151,96 | 69 | 56,47 | . | 103,23 | 203,98 |
| 27 | 54,95 | . | 91,58 | 64,36 | 70 | 575,12 | 38.781,09 | 136,82 | 141,79 |
| 28 | 61,39 | . | 66,83 | 64,36 | 71 | 133,17 | . | 210,40 | 396,04 |
| 29 | 60,20 | . | 65,92 | 77,11 | 72 | 247,54 | . | 233,99 | 615,76 |
| 30 | 112,00 | . | 63,75 | 67,50 | 73 | 65,52 | . | 209,36 | 492,61 |
| 31 | 109,45 | . | 101,99 | 77,11 | 74 | 83,66 | . | 259,90 | 915,84 |
| 32 | 54,48 | 6.467,66 | 360,70 | 398,01 | 75 | 73,91 | 10.679,61 | 121,36 | 162,62 |
| 33 | 116,50 | . | 450,00 | 850,00 | 76 | 83,66 | . | 198,02 | 346,53 |
| 34 | 92,33 | . | 91,58 | 128,71 | 77 | 153,96 | . | 210,40 | 495,05 |
| 35 | 132,18 | . | 222,77 | 272,28 | 78 | 231,09 | . | 119,57 | 178,26 |
| 36 | 386,11 | 39.368,69 | 138,89 | 131,31 | 79 | 116,67 | . | 199,00 | 348,26 |
| 37 | 110,25 | . | 105,00 | 95,00 | 80 | 132,51 | . | 172,41 | 307,88 |
| 38 | 70,00 | . | 125,00 | 130,00 | 81 | 208,96 | 20.707,07 | 593,43 | 1.136,36 |
| 39 | 103,98 | . | 124,38 | 129,35 | 82 | 58,71 | . | . | . |
| 40 | 148,77 | . | 209,36 | 216,75 | 83 | 167,57 | . | 470,30 | . |
| 41 | 42,59 | 4.899,50 | 628,14 | 1.130,65 | 84 | 61,69 | . | 1.853,23 | . |
| 42 | 79,00 | . | 125,00 | 160,00 | 85 | 350,49 | 32.926,83 | 292,68 | 609,76 |
| 43 | 365,67 | . | 385,57 | 621,89 | 86 | 57,67 | . | . | 108,91 |

Tabela 5 Comparação das médias e desvios (DP) das concentrações de E2 (pg/g) e P4 (ng/g) encontradas em extratos fecais liofilizados da fêmea A de cachorro-donato-vinagre dosados ao longo do ano de 2005 pelo método de quimioluminescência ($\alpha = 0,05$):

| Mês | N - E2 | Média (DP) - E2 | N - P4 | Média (DP) - P4 |
|-----|--------|-------------------------|--------|-------------------------|
| 3 | 2 | 117,95 ($\pm 54,87$) | 2 | 187,88 ($\pm 52,50$) |
| 4 | 5 | 151,18 ($\pm 171,84$) | 5 | 218,51 ($\pm 165,42$) |
| 5 | 7 | 114,71 ($\pm 62,35$) | 6 | 198,90 ($\pm 84,64$) |
| 6 | 8 | 111,06 ($\pm 59,20$) | 8 | 242,82 ($\pm 227,37$) |
| 7 | 8 | 148,60 ($\pm 113,83$) | 9 | 180,84 ($\pm 255,37$) |
| 8 | 9 | 103,77 ($\pm 58,60$) | 10 | 266,10 ($\pm 236,75$) |
| 9 | 10 | 141,82 ($\pm 113,25$) | 10 | 159,76 ($\pm 96,28$) |
| 10 | 11 | 130,96 ($\pm 148,09$) | 11 | 221,52 ($\pm 201,42$) |
| 11 | 11 | 148,10 ($\pm 150,06$) | 11 | 168,99 ($\pm 100,37$) |
| 12 | 5 | 72,99 ($\pm 27,23$) | 6 | 210,89 ($\pm 183,46$) |

Tabela 6: Comparação das médias e desvios (DP) das concentrações de E2 (pg/g) e P4 (ng/g) encontradas em extratos fecais liofilizados da fêmea A de cachorro-donato-vinagre dosados ao longo do ano de 2005 pelo método de radioimunoensaio ($\alpha=0,05$):

| Mês | N - E2 | Média (DP) - E2 | N - P4 | Média (DP) - P4 |
|-----|--------|-----------------------|--------|-------------------------|
| 3 | - | - | 2 | 240,42 ($\pm 101,94$) |
| 4 | 2 | 31,27 ($\pm 30,67$) | 5 | 227,69 ($\pm 225,30$) |
| 5 | 1 | 43,53 (0,00) | 7 | 362,72 ($\pm 301,64$) |
| 6 | 2 | 17,96 ($\pm 0,64$) | 7 | 216,61 ($\pm 164,22$) |
| 7 | 2 | 32,10 ($\pm 0,11$) | 6 | 226,80 ($\pm 221,22$) |
| 8 | 2 | 22,04 ($\pm 16,32$) | 9 | 353,80 ($\pm 354,70$) |
| 9 | 2 | 18,07 ($\pm 16,88$) | 9 | 273,87 ($\pm 197,24$) |
| 10 | 2 | 29,96 ($\pm 34,41$) | 10 | 359,90 ($\pm 270,46$) |
| 11 | 2 | 38,94 ($\pm 47,46$) | 11 | 293,73 ($\pm 272,72$) |
| 12 | 2 | 2,86 ($\pm 0,32$) | 5 | 306,36 ($\pm 199,42$) |

Tabela 7: Comparação das médias e desvios (DP) das concentrações de E2 (pg/g) e P4 (ng/g) encontradas em extratos fecais liofilizados da fêmea B de cachorro-donato-vinagre dosados ao longo do ano de 2005 pelo método de quimioluminescência ($\alpha = 0,05$):

| Mês | N - E2 | Média (DP) - E2 | N - P4 | Média (DP) - P4 |
|-----|--------|-------------------------|--------|-------------------------|
| 3 | 1 | 87,56 (0,00) | 1 | 4,15 (0,00) |
| 4 | 4 | 114,45 ($\pm 71,17$) | 4 | 97,25 ($\pm 132,23$) |
| 5 | 7 | 150,48 ($\pm 75,56$) | 7 | 305,21 ($\pm 315,09$) |
| 6 | 9 | 163,65 ($\pm 120,36$) | 10 | 160,40 ($\pm 101,98$) |
| 7 | 11 | 88,11 ($\pm 45,02$) | 11 | 245,56 ($\pm 256,54$) |
| 8 | 10 | 153,09 ($\pm 121,33$) | 10 | 215,57 ($\pm 169,12$) |
| 9 | 10 | 108,49 ($\pm 69,76$) | 11 | 258,29 ($\pm 151,03$) |
| 10 | 11 | 136,30 ($\pm 73,08$) | 12 | 230,87 ($\pm 173,99$) |
| 11 | 12 | 159,30 ($\pm 145,78$) | 12 | 196,16 ($\pm 68,08$) |
| 12 | 8 | 144,28 ($\pm 99,85$) | 5 | 345,56 ($\pm 181,15$) |

Tabela 8: Comparação das médias e desvios (DP) das concentrações de E2 (pg/g) e P4 (ng/g) encontradas em extratos fecais liofilizados da fêmea B de cachorro-donato-vinagre dosados ao longo do ano de 2005 pelo método de radioimunoensaio ($\alpha = 0,05$):

| Mês | N - E2 | Média (DP) - E2 | N - P4 | Média (DP) - P4 |
|-----|--------|-----------------------|--------|-------------------------|
| 4 | 2 | 10,67 ($\pm 5,64$) | 2 | 310,45 ($\pm 331,07$) |
| 5 | 2 | 24,02 ($\pm 11,09$) | 7 | 329,29 ($\pm 261,98$) |
| 6 | 2 | 33,67 ($\pm 6,96$) | 9 | 291,13 ($\pm 203,90$) |
| 7 | 2 | 9,06 ($\pm 3,66$) | 10 | 264,51 ($\pm 298,52$) |
| 8 | 2 | 22,14 ($\pm 24,37$) | 9 | 209,48 ($\pm 163,94$) |
| 9 | 2 | 7,72 ($\pm 1,11$) | 10 | 307,22 ($\pm 168,21$) |
| 10 | 2 | 16,30 ($\pm 8,20$) | 11 | 323,20 ($\pm 237,30$) |
| 11 | 2 | 24,73 ($\pm 19,87$) | 12 | 395,50 ($\pm 225,86$) |
| 12 | 2 | 26,82 ($\pm 8,64$) | 4 | 343,70 ($\pm 205,93$) |

Tabela 10: Custos (R\$) dos kits em cada método de dosagem hormonal calculados por amostra fecal:

| MÉTODOS | VALOR POR AMOSTRA (R\$) |
|----------------------------|--------------------------------|
| Quimioluminescência | 29,64 |
| Radioimunoensaio | 24,60 |

Figuras

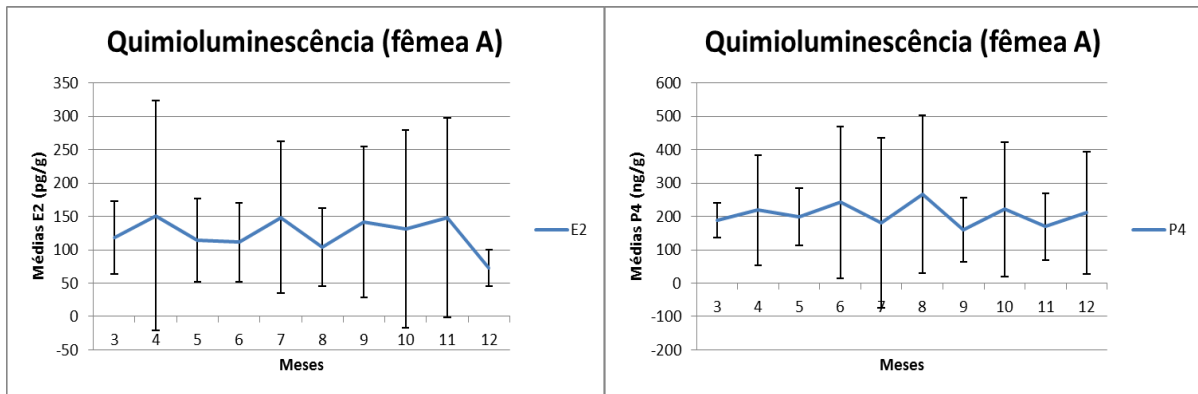


Figura 1: Médias e desvios-padrão das concentrações de estradiol (E2) e progesterona (P4) encontradas em extratos fecais liofilizados da fêmea A de cachorro-do-mato-vinagre dosados segundo os meses de coleta de amostras pelo método de quimioluminescência.

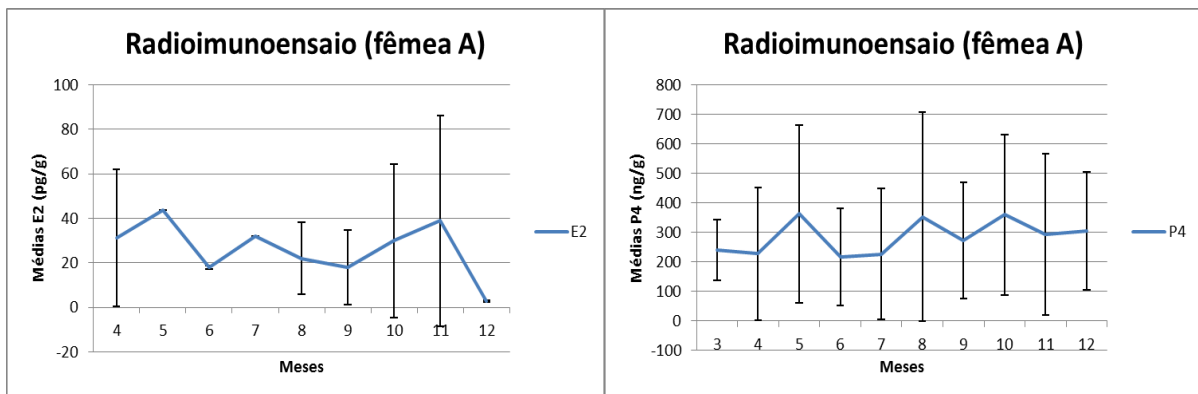


Figura 2: Médias e desvios-padrão das concentrações de estradiol (E2) e progesterona (P4) encontradas em extratos fecais liofilizados da fêmea A de cachorro-do-mato-vinagre dosados segundo os meses de coleta de amostras pelo método de radioimunoensaio.

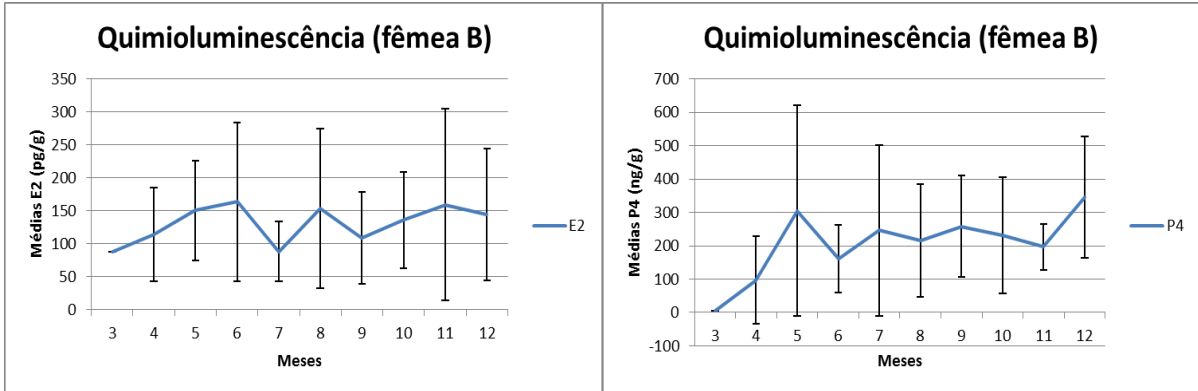


Figura 3: Médias e desvios-padrão das concentrações de estradiol (E2) e progesterona (P4) encontradas em extratos fecais liofilizados da fêmea B de cachorro-do-mato-vinagre dosados segundo os meses de coleta de amostras pelo método de quimioluminescência.

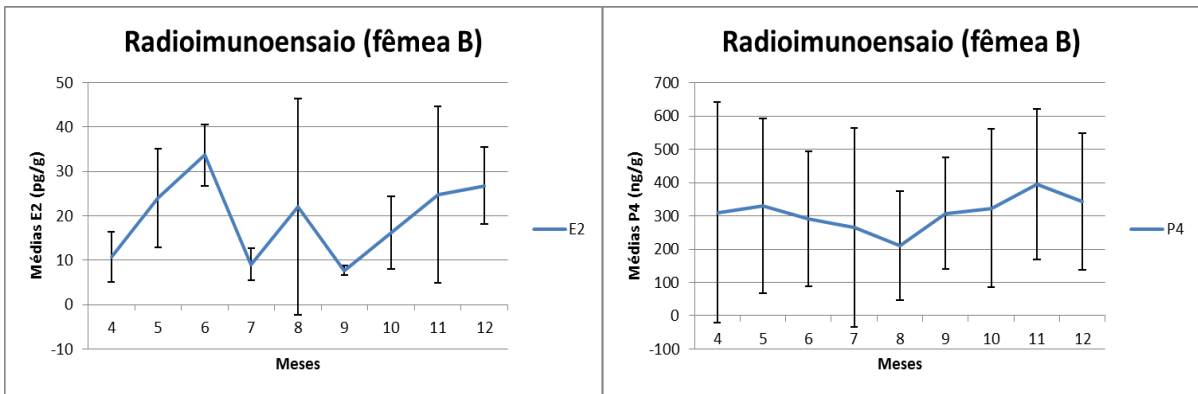


Figura 4: Médias e desvios-padrão das concentrações de estradiol (E2) e progesterona (P4) encontradas em extratos fecais liofilizados da fêmea B de cachorro-do-mato-vinagre dosados segundo os meses de coleta de amostras pelo método de radioimunoensaio.