MARIE ODILE MONIER CHELINI

Estudo comparativo de protocolos
de extração de hormônios
esteróides fecais em diferentes
espécies de animais

São Paulo

2006

MARIE ODILE MONIER CHELINI

**Estudo comparativo de protocolos de
extração de hormônios esteróides fecais em
diferentes espécies de animais**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira

São Paulo
2006

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a for

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1626
FMVZ

Chelini, Marie Odile Monier

Estudo comparativo de protocolos de extração de hormônios esteróides fecais em diferentes espécies de animais / Marie Odile Monier Chelini. – São Paulo : M. O. M. Chelini, 2006.

84 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2006.

Programa de Pós-graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira.

1. Esteróides. 2. Metabólitos fecais. 3. Extração. 4. Recuperação. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo comparativo de protocolos de extração de hormônios esteróides fecais em diferentes espécies de animais selvagens, domésticos e de laboratório", protocolo nº366/2003, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Claudio Alvarenga de Oliveira, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 29/10/03.

(We certify that the Research "Comparative study of fecal steroid extraction protocols in wild, domestic and laboratory species" protocol number 366/2003, under the responsibility of Prof. Dr. Claudio Alvarenga de Oliveira, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in 10/29/2003, meeting.

São Paulo, 31 de outubro de 2003

Profª Drª Julia Maria Macêdo
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: CHELINI Marie Odile Monier

Título: Estudo comparativo de protocolos de extração de hormônios esteróides
fecais em diferentes espécies de animais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Medicina
veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

A Antonio, Maria Júlia e Marie Claire.

*Sem o seu apoio incondicional, nada
teria sido possível!*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr Cláudio Alvarenga de Oliveira pela confiança que ele depositou em mim desde o início da nossa colaboração.

Ao Prof. Dr Mário Binelli pelo apoio, os ensinamentos preciosos e mais ainda por ter fornecido o hormônio progesterona marcado radioativamente indispensável à realização deste trabalho.

À Prof. Dra Ieda Therezinha do Nascimento Verreschi do Laboratório de Endocrinologia da Universidade Federal do Estado de São Paulo (UNIFESP) que autorizou o fornecimento pelo laboratório dos hormônios cortisol e testosterona marcados radioativamente sem os quais este estudo não poderia ser realizado.

Às biomédicas Ivone F. Bianco e Lílian F. Hayashi, do Laboratório de Endocrinologia da Universidade Federal do Estado de São Paulo (UNIFESP), pela gentileza e disponibilidade no fornecimento dos hormônios cortisol e testosterona.

Ao Prof. Dr. Fábio Bessa do Laboratório de Endocrinologia do Tecido Adiposo do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo por permitir o uso do contador de radiação β do laboratório.

À técnica Sandra e às pós-graduandas do Laboratório de Endocrinologia do Tecido Adiposo pela ajuda preciosa e sempre bem humorada na hora de usar um aparelho para mim cheio de mistérios!

Às pesquisadoras e amigas Adriana Capezzuto, Angélica da Silva Vasconcellos, Christiane Schilbach Pizzutto, Mariana Gonçalves, Priscila Viau Furtado e Thaís Guimarães pelo fornecimento das amostras fecais, valiosa matéria prima deste estudo.

Às amigas pesquisadoras Angélica da Silva Vasconcellos e Christiane Schilbach Pizzutto pela colaboração na compra de tubos de cintilação.

À minha amiga Lílian Rangel de Castilhos, não só pelas fotos que ilustram este trabalho como pelas conversas muito estimulantes.

À amiga, colega de pós-graduação e de laboratório Priscila Viau Furtado que antes mesmo de assumir o cargo de técnica já ajudava a nós todos com seus conselhos experientes.

À minha filha Marie Claire pela linda foto da capa deste trabalho.

À minha grande amiga Érika Gutierrez Felipe pelo convívio alegre, a disponibilidade e a competência durante os anos em que era responsável pelo Laboratório de Dosagens Hormonais da nossa Faculdade. Seu papel na idealização deste projeto foi fundamental.

A todos os colegas e amigos do LDH que me ajudaram a entender que ...
somente o céu é o limite! Obrigada pelos momentos fortes e alegres que nós
compartilhamos.

A Harumi Dói Shiraishi, secretária do Programa de Pós Graduação em
Reprodução Animal da FMVZ que muito me ajudou a desfazer os nós
burocráticos que amarram a vida de todo pós-graduando.

A todos os professores, funcionários e pós-graduandos da FMVZ e, em
especial, do Departamento de Reprodução Animal com os quais foi tão gostoso
conviver.

Ao CNPq pela concessão de uma bolsa durante a realização desta pesquisa.

RESUMO

RESUMO

CHELINI, M. O. M. **Estudo comparativo de protocolos de extração de hormônios esteróides fecais em diferentes espécies de animais.** [Comparative study of methods for extracting steroid hormones from feces of several animal species]. 2006. 84 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Desde as primeiras dosagens de hormônios esteróides efetuadas em fezes por Adlercreuetz em 1976, os estudos baseados no uso desta técnica se multiplicaram com animais selvagens, como também em algumas espécies domésticas e, mais recentemente, em animais de laboratório. Diversos protocolos para a extração dos esteróides fecais foram elaborados e estão disponíveis na literatura. A eficiência dos mesmos pode ser avaliada medindo a sua capacidade de recuperar uma quantidade conhecida de hormônio marcado radioativamente e incorporado a algumas amostras fecais antes de submetê-las ao processo de extração. O presente trabalho teve por objetivo a determinação da capacidade de recuperação de três protocolos de extração de esteróides fecais dentre os mais freqüentemente empregados no nosso meio. São eles os protocolos descritos respectivamente por Brown et al. (1994), Graham et al. (2001) e Schwarzenberger et al. (1991). O estudo abrange sete espécies: hamster Sírio (*Mesocricetus auratus*), cutia (*Dasyprocta aguti*), lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*), cabra doméstica (*Capra hircus*), ovelha doméstica (*Ovis aries*), chimpanzé (*Pan troglodytes*), gorila (*Gorilla gorilla*) e orangotango (*Pongo pygmaeus*) e três hormônios: progesterona, testosterona e cortisol. O protocolo de Graham alcançou maiores índices de recuperação da progesterona e da testosterona triciada. O protocolo de Schwarzenberger

mostrou-se mais eficiente, do ponto de vista numérico, na recuperação do cortisol triciado. Os resultados obtidos sugerem, porém, que a metodologia empregada para avaliação da capacidade de recuperação dos três protocolos subestimou a eficiência do protocolo de Brown.

Palavras-chave: Esteróides. Metabólitos fecais. Extração. Recuperação

ABSTRACT

ABSTRACT

CHELINI, M. O. M. **Comparative study of methods for extracting steroid hormones from feces of several animal species.** [Estudo comparativo de protocolos de extração de hormônios esteróides fecais em diferentes espécies de animais]. 2006. 84 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Adlercreutz performed the first quantifications of steroid hormones in human feces in 1976. Since then, studies based on this technique have been applied to wildlife, domestic animals, and recently to laboratory animals. Several procedures for extracting fecal steroids were established and are available in the literature. It is possible to assess the efficiency of these techniques measuring how they recover known amounts of radio-labelled hormones added to some fecal samples just before extraction. The aim of this study was to determine the recovery of three procedures for fecal steroid extraction that are commonly used in our laboratory. We assessed, then, how the techniques described by Brown et al. (1994), Graham et al. (2001) and Schwarzenberger et al. (1991) recover ^3H -progesterone, ^3H -testosterone and ^3H -cortisol in the feces from eight animal species: Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*), agouti (*Dasyprocta aguti*), maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*), goat (*Capra hircus*), sheep (*Ovis aries*), chimpanzee (*Pan troglodytes*), gorilla (*Gorilla gorilla*) e orangutan (*Pongo pygmaeus*). Average recovery of Graham et al. (2001) procedure was higher for progesterone and testosterone and Schwarzenberger et al. (1991) procedure recovered more cortisol. However, our results suggested that the efficiency of the method established by Brown et al. (1994)

was underestimated.

Key words: Steroid hormones. Fecal metabolites. Extraction. Recovery

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	HIPÓTESE	24
3	OBJETIVOS	26
4	REVISÃO DE LITERATURA	28
5	MATERIAL E MÉTODOS	37
5.1	ESPÉCIES E HORMÔNIOS ESTUDADOS.....	37
5.2	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	37
5.3	HORMÔNIOS TRICIADOS	39
5.4	EXTRAÇÃO DOS ESTERÓIDES FECALIS	39
5.4.1	Protocolos de Extração Testados	40
5.4.1.1	Protocolo 1 (Brown et al., 1994)	40
5.4.1.2	Protocolo 2 (Graham et al., 2001).....	42
5.4.1.3	Protocolo 3 (Schwarzenberger et al., 1991).....	43
5.4.2	Procedimento de Extração	45
5.5	AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DOS PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO	46
5.5.1	Contagem da Radioatividade	46
5.5.1.1	Contagem nos Extratos Fecais	46
5.5.1.2	Controle da Proporcionalidade da Leitura	47
5.5.1.3	Exatidão	48

5.5.1.4	Teste de Diluição de Cor	49
5.5.2	Cálculo da Porcentagem de Recuperação	49
5.6	ANÁLISE DOS RESULTADOS	50
5.6.1	Análise Estatística	50
5.6.2	Outros Aspectos	51
6	RESULTADOS	53
6.1	RADIOATIVIDADE NOS TUBOS-CONTROLE (BLANK) . .	53
6.2	PROPORCIONALIDADE DA LEITURA	53
6.3	EXATIDÃO	54
6.4	TESTE DE EFEITO DA COR	55
6.5	PORCENTAGENS DE RECUPERAÇÃO	56
6.6	PRECISÃO	57
6.7	CORRELAÇÃO ENTRE PORCENTAGENS DE RECUPERAÇÃO E COEFICIENTES DE EXATIDÃO DAS CONTAGENS	58
6.8	RECUPERAÇÃO DA PROGESTERONA NAS FEZES DE CHIMPANZÉ, GORILA E ORANGOTANGO PELO PROTOCOLO 1 DE BROWN MODIFICADO	59
7	DISCUSSÃO	61
8	CONCLUSÕES	73
	REFERÊNCIAS	76

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O uso de excrementos de animais para finalidades médicas tem uma longa tradição. Os antigos egípcios receitavam a inalação de esterco carbonizado de crocodilo para o tratamento da histeria feminina e fezes de lagartos eram usadas como produto de beleza (LAPORTE, 2000¹ apud ZIEGLER; WITTWER, 2005, p. 160). Diagnósticos baseados em análises fecais também não são nenhuma novidade científica. Contudo, foi só recentemente que se começou a tirar partido do fato de que as fezes contêm hormônios eliminados pela circulação e capazes de fornecer informações sobre a fisiologia interna de um indivíduo. A primeira extração hormonal, em fezes humanas, foi realizada em 1976 por Adlercruetz et al.² (apud ZIEGLER; WITTWER, 2005, p. 160) para a determinação de perfis de esteróides reprodutivos. Na medicina veterinária, a quantificação de hormônios fecais foi usada num primeiro tempo com animais domésticos (BAMBERG et al., 1984; CHOI et al., 1987; DESAULNIERS et al., 1989). Logo, porém, seu caráter não invasivo abriu-lhe um extenso campo de aplicações no monitoramento das funções reprodutivas de animais selvagens, de vida livre ou mesmo mantidos em cativeiro, porém de manejo difícil (GRAHAM et al., 2001; LASLEY; KIRKPATRICK, 1991; MIYAMOTO et al., 2001; MORAIS et al., 2002; MORATO et al., 2004_a; MORATO et al., 2004_b; MOREIRA et al., 2001; SCHWARZENBERGER et al., 1996; WASSER et al., 2000). Mais recentemente

¹ LAPORTE, D. **The history of shit**. Londres: MIT Press. Tradução de Histoire de la Merde, 1978, por N. Benabid e Rodolphe el-Khoury.

² ADLERCREUTZ, H.; MARTIN, F.; PULKKINEN, M.; DENCKER, H.; RIMER, U.; SJOBERG, N.O.; TIKKANEN, M.J. Intestinal metabolism of estrogens. **Journal of Clinical and Endocrinological Metabolism**, v. 43, p. 497-505, 1976.

vislumbrou-se nela a possibilidade de estudar os efeitos de múltiplos agentes estressores sem necessidade de contenção física nem química, nem interferência no comportamento dos animais (BAMBERG et al., 2001; HAYSEN et al., 2002; TOUMA et al., 2003; WASSER et al., 2000).

Nos animais de laboratório, tendo em vista o seu tamanho reduzido, a colheita de amostras sanguíneas de volume suficiente para dosagens hormonais supõe, geralmente, o uso de técnicas cruentas como a punção cardíaca (CCAC, 2003; DE LUCA et al., 1996; TALAMANTES et al., 1984), quando não a eutanásia do sujeito (KISHI et al., 1995), impossibilitando estudos endocrinológicos longitudinais. A procura por métodos alternativos capazes de reduzir o número de animais usados na experimentação levou à aplicação da quantificação de hormônios fecais também nestas espécies (BAMBERG; PALME; MEINGASSNER, 2001; BILLITTI; LASLEY; WILSON, 1998; CHELINI et al., 2005; CHELINI et al., In press³; HAYSEN; HARPER; DEFINA, 2002; TOUMA et al., 2003). Em maior conformidade com os conceitos éticos e humanitários que devem reger a experimentação animal (RUSSEL; BURCH, 1992), este método ainda permite o acompanhamento dos níveis hormonais de um mesmo animal ao longo do tempo, conferindo assim maior precisão aos resultados.

A inativação dos hormônios esteróides ocorre principalmente no fígado e, em menor proporção, no rim. Ela envolve reações enzimáticas de redução e conjugação com glucuronídeos e sulfatos e resulta em substâncias muito menos ativas e mais solúveis em água que podem ser excretadas na urina ou

³ CHELINI, M.O.M.; SOUZA, N.L.; CORTOPASSI, S.R.G.; FELIPPE, E.C.G., OLIVEIRA, C.A. Assessement of the physiological stress response by quantification of fecal corticosteroids. **Contemporary Topics in Laboratory Animal Science**, In press.

nas fezes. As vias preferenciais de excreção e respectivas proporções de metabólitos excretados por uma ou outra via variam de espécie para espécie. Amostras fecais apresentam, porém, sobre a urina, na qual dosagens hormonais também são possíveis, a facilidade de obtenção (SCHWARZENBERGER et al., 1996).

Por todos estes motivos, a técnica de quantificação de hormônios fecais vem ganhando espaço, nos últimos anos, como ferramenta poderosa nos campos da reprodução animal, da biologia e medicina da conservação, assim como da ecologia comportamental, para um número cada vez maior de espécies.

Diversos protocolos de extração dos esteróides fecais para posterior quantificação por radioimunoensaio ou enzima-imunoensaio foram desenvolvidos. Baseados na natureza lipídica dos esteróides, a maioria deles consiste na dissolução dos metabólitos em solventes orgânicos, álcoois (BROWN et al., 1994; CHELINI et al., 2005; GRAHAM et al., 2001; LYNCH et al., 2003; MÖHLE et al., 2002; MORAIS et al., 2002; MORATO et al., 2004_a; MORATO et al., 2004_b; MOREIRA et al., 2001; MORELAND et al., 2001; WASSER; MONTFORT; WILDT, 1991) ou éteres (BAMBERG et al., 1984; MATSUMORO et al., 1999; MIYAMOTO et al., 2001; SCHWARZENBERGER et al., 1991). Alguns empregam soluções aquosas como solventes (BARDI et al., 2003; BARRETT et al., 2002; FUJITA et al., 2001; HEISTERMANN; TARI; HODGES, 1993; KIRKPATRICK et al., 1991; SHIDELER et al., 1993) e muitos fazem uso de técnicas mixtas (BAHR et al., 2000; GRAHAM et al., 1995; LYNCH; ZIEGLER; STRIER, 2002; MÖHLE et al., 2002; PALME et al., 1996; PALME et al., 1997; STRIER; ZIEGLER, 1997; ZIEGLER et al., 1996).

A eficiência dos protocolos de extração pode ser avaliada medindo a sua capacidade de recuperar uma quantidade conhecida de hormônio marcado radioativamente e incorporado a algumas amostras fecais antes de submetê-las ao processo de extração. Tal eficiência é afetada pelas características da matéria fecal de cada espécie e, também, pelas condições laboratoriais nas quais a extração é realizada. Visando a minimização de erros, no sentido de assegurar a máxima qualidade do trabalho e, conseqüentemente, a obtenção de resultados confiáveis, a escolha por um laboratório do protocolo mais conveniente de extração dos metabólitos de determinado hormônio, nas fezes de determinada espécie, nas suas próprias condições de trabalho, exige a realização prévia de testes comparativos. Podem ser assim determinadas a recuperação absoluta e a recuperação relativa. A primeira mostra a variação entre a quantidade obtida após a extração e aquela decorrente da adição após a extração. A recuperação relativa expressa a variação decorrente do tratamento das mesmas amostras por metodologias diferentes (RIBEIRO NETO, 1999).

O objetivo principal do presente estudo consiste na determinação da recuperação relativa de três protocolos de extração de esteróides fecais, entre os mais freqüentemente empregados no nosso meio, para três hormônios: progesterona, testosterona e cortisol. Ele abrange oito espécies: hamster Sírio (*Mesocricetus auratus*), cutia (*Dasyprocta aguti*), lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*), cabra doméstica (*Capra hircus*), ovelha doméstica (*Ovis aries*), chimpanzé (*Pan troglodytes*), gorila (*Gorilla gorilla*) e orangotango (*Pongo pygmaeus*).

2 HIPÓTESE

2 HIPÓTESE

Para as espécies e os hormônios estudados, nas nossas condições laboratoriais, entre os três protocolos testados, aquele descrito por Graham et al. (2001) pode ser indicado como método de eleição para a extração de metabólitos fecais.

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

O nosso objetivo consistia em testar a hipótese acima e para isso:

- Avaliar a capacidade de recuperação de três protocolos de extração de esteróides fecais para metabólitos de progesterona, testosterona e cortisol nas fezes de oito espécies animais: hamster Sírio (*Mesocricetus auratus*), cutia (*Dasyprocta aguti*), lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*), cabra doméstica (*Capra hircus*), ovelha doméstica (*Ovis aries*), chimpanzé (*Pan troglodytes*), gorila (*Gorilla gorilla*) e orangotango (*Pongo pygmeaus*).
- Analisar as vantagens e desvantagens de cada método nas nossas condições laboratoriais.
- Fornecer a outros pesquisadores da área subsídios para a determinação dos protocolos de eleição para diversas espécies e hormônios.

4. REVISÃO DE LITERATURA

É interessante acompanhar, na literatura, a evolução dos métodos desenvolvidos para isolar das fezes os metabólitos de hormônios esteróides. Em 1984, em Viena, na Áustria, Möstl et al. realizavam, nas fezes de vacas, uma extração em duas etapas. A primeira fazia uso de clorofórmio e hidróxido de sódio e era seguida de uma centrifugação, após a qual o sobrenadante era re-extraído com éter de petróleo e dietiléter. A fase aquosa era então congelada, e a fase orgânica era decantada e evaporada sob um fluxo de nitrogênio num banho-maria a 60°C. A recuperação de estradiol marcado com trício e acrescentado às fezes antes do procedimento não ultrapassava 50%. A mesma equipe publicava, no mesmo ano, um estudo sobre a determinação de estrógenos nas fezes de éguas (BAMBERG et al., 1984). A técnica de extração usada neste trabalho era derivada daquela descrita acima, porém, mais complexa ainda. As primeiras etapas eram invertidas, a primeira sendo repetida duas vezes antes da secagem e, após acidificação com ácido acético da fase alcalina, esta era submetida a uma terceira etapa de extração com dietiléter. A fase de éter era, então, separada e evaporada pela segunda vez. Apesar destes cuidados suplementares, a recuperação continuava de aproximadamente 50%. Uma variação um pouco mais simples desta técnica foi usada em 1987 por Choi et al., para extrair estrógenos das fezes de porcas com uma recuperação ainda próxima de 50% e, por Bamberg et al. em 1991, nas fezes de diversas espécies de animais selvagens entre os quais o gorila e o orangotango. Nos estudos publicados em 1991 e 1992, Schwarzenberger et al., ainda trabalhando com fezes de éguas, adotaram dois protocolos de

extração diferentes. O primeiro destinava-se à extração dos estrógenos. Nele, hidróxido de potássio e, a seguir, uma mistura de clorofórmio e n-hexano eram adicionados às fezes e o conjunto agitado e centrifugado. O sobrenadante alcalino era, então, destinado aos ensaios de quantificação. Para extrair os progestágenos, a equipe usava metanol 95% e éter de petróleo. Após agitação e centrifugação, as dosagens eram efetuadas na fração de metanol. A recuperação dos progestágenos por esta última técnica alcançava 90% aproximadamente, o que justifica seu uso nas fezes de rinoceronte por Schwarzenberger, Francke e Göltenboth (1993), nas fezes de felinos por Graham et al. em 1995 e nas fezes de muriquis por Strier e Ziegler em 1997. Neste trabalho, os pesquisadores acrescentaram às fezes em suspensão no metanol um pouco de óxido de alumínio, cuja função era de remover da amostra parte dos seus pigmentos. Diluindo simplesmente fezes de égua em água destilada, a equipe de Kirkpatrick (1991) conseguia recuperar 87% do sulfato de estrona triciado acrescentado antes da extração. Shideler et al. (1993), por sua vez, relatam ter melhorado a eficiência de um protocolo de retirada dos esteróides das fezes de *Macaca fascicularis* por diluição em tampão fosfato, adicionando a este 20% de metanol. Eles obtiveram com esta técnica porcentagens de recuperação de 61 a 78%. Resultados semelhantes foram obtidos, ainda em 1991, por Wasser, Montfort e Wildt, na extração do estradiol e da progesterona das fezes de babuíno. Todavia, o protocolo usado nesse estudo era extremamente complexo e incluía o uso de diversos solventes como o etanol, a acetona, o diclorometano e o metanol, três etapas de agitação ou homogeneização seguida de centrifugação e duas secagens no fluxo de nitrogênio. A mesma técnica, com poucas modificações foi adotada por

Heistermann, Tari e Hodges (1993) para extrair estrógenos e progestágenos das fezes de duas espécies de primatas neotropicais. Num estudo que pode ser considerado como antológico por ter, senão inspirado, pelo menos fornecido bases para muitas das pesquisas realizadas no Brasil sobre a reprodução de animais selvagens, Brown, Wasser, Wildt e Graham retomavam em 1994 o protocolo de extração desenvolvido por Wasser et al. em 1991, simplificando-o e comparando, quanto à eficiência, diversas variações. Trabalhando com fezes de várias espécies de felinos, os autores abandonaram o uso da acetona e do diclorometano que, segundo os testes realizados, não aumentavam o poder de recuperação do método. Após ter testado diversas concentrações do etanol no qual as fezes eram fervidas, ferver uma ou duas vezes, aumentar a quantidade de etanol, substituir o etanol por metanol, mostraram que a técnica mais eficiente era aquela descrita na sessão material e método do presente trabalho e cujo fluxograma está representado na figura 1. Recuperaram com ele mais de 90% do estradiol e da progesterona, marcados radioativamente ou não, adicionados às fezes antes da extração. Este método vem sendo usado desde então com sucesso, não somente pela equipe que o desenvolveu (FOLEY; PAPAGEORGE; WASSER, 2001; WASSER et al., 2000; YOUNG et al., 2004) como por outros pesquisadores (CRICHTON et al., 2003), às vezes com pequenas modificações: Thompson, Mashburn e Monfort (1998) e Thompson e Monfort (1999), trabalhando com fezes de antílope, aumentaram para 100% a concentração do etanol, enquanto Harper e Austad (2001) e Hayssen, Harper e DeFina (2002) diluíam o extrato já seco, obtido de fezes de

camundongos, numa solução de acetato de etilo e hexano. Após evaporação desta solução o resíduo era ressuspendido em etanol. Infelizmente os autores

não informam se esta modificação resultou em aumento da capacidade de recuperação do protocolo. Tendo obtido resultados relativamente modestos com o protocolo de Brown nas fezes de equidna, (recuperação de 67,5 e 79,7% respectivamente para estradiol e testosterona), Oates et al. (2002) testaram outro baseado no emprego do dietiléter como solvente, com resultados bem inferiores (18,2 e 17,4% respectivamente para o estradiol e a testosterona). A mesma comparação foi efetuada em 2004 por Bradshaw et al., num estudo da endocrinologia reprodutiva de *Tarsipes rostratus*, um marsupial australiano. Apesar dos altos índices alcançados pelos dois protocolos, a fervura em etanol acabou sendo adotada pelos autores por sua eficiência um pouco superior na recuperação do estradiol e seu menor coeficiente de variação. No Brasil, a técnica de fervura em etanol 90% era, até recentemente, o protocolo de eleição, e a mesma foi usada num leque bastante aberto de espécies de animais, tanto selvagens, como domésticos e de laboratório (BERBARE, 2004; CAPEZZUTO, 2005; CHELINI et al., 2005; CHELINI et al., In press¹; MORAIS et al., 2002; MORATO et al., 2004; MORATO et al., 2004; MOREIRA et al., 2001; MORELAND et al., 2001; VASCONCELLOS, 2004; VIAU, 2004). Em 1996, Palme et al. descreviam um protocolo de extração baseado no mesmo solvente, porém, mais simples: as amostras fecais de animais domésticos eram diluídas numa solução de metanol em água e após ter sido agitada durante 30 minutos, a mistura era centrifugada. As etapas de ebulição e evaporação para

¹ CHELINI, M.O.M.; SOUZA, N.L.; CORTOPASSI, S.R.G.; FELIPPE, E.C.G., OLIVEIRA, C.A. Assessement of the physiological stress response by quantification of fecal corticosteroids. **Contemporary Topics in Laboratory Animal Science**, In press.

posterior ressuspensão eram assim eliminadas. Para aumentar a taxa de recuperação dos metabólitos apolares de esteróides, a operação era repetida, desta vez com uma solução mais concentrada de metanol. A mesma técnica seria adotada por muitos outros pesquisadores com variações na concentração do metanol e no tempo de agitação. A segunda extração com metanol foi rapidamente eliminada (BAMBERG; PALME; MEINGASSNER, 2001; HEISTERMANN et al., 1996; MILLSPAUGH; WASHBURN, 2003; PARIS et al., 2002; RABIEE; MACMILLAN; SCHWARZENBERGER, 2001; TOUMA et al., 2003; TOUMA; PALME; SACHSER, 2004). Fieß, Heistermann e Hodges (1999), por exemplo, recuperavam 85,6% da progesterona marcada acrescentada à totalidade das 512 amostras extraídas com uma única etapa de 15 minutos de agitação das fezes em metanol 80%. Ziegler e Wittwer (2005) recomendam, para fezes de primatas, um tempo mínimo de 10 minutos de agitação em vortex. Muir et al. (2001) adicionaram óxido de alumínio à solução de metanol e obtiveram uma recuperação de 88,9% para oestradiol, 99,0% para a testosterona, mas somente 31,5% para os conjugados de estrona. Num estudo bastante abrangente publicado em 2000, Wasser e colaboradores compararam os dois protocolos de extração pelo metanol, com ou sem ebulição. As altas porcentagens de recuperação (entre 90 e 100% dependendo da espécie e do hormônio) alcançadas pelos dois métodos levaram os autores a considerá-los como equivalentes e a adotar o segundo, mais simples, em trabalhos posteriores (HUNT; TRITES; WASSER, 2004). Uma variação desta mesma técnica foi proposta por Graham et al. em 2001. Ela consiste em agitar as amostras fecais diluídas em metanol não mais no vortex durante 30 minutos, e sim, suavemente, num homogeneizador de sangue ao longo de 12 a 14

horas. A técnica assim modificada foi usada com sucesso por Pereira, Duarte e Negrão (2005) nas fezes do veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus bezoarticus*) e por Pereira e colaboradores (In press)² nas fezes de outro veado *Mazama gouazoubira* com uma recuperação de 64,3% da progesterona acrescentada às fezes de 3 amostras antes da extração. Graham (2001)³, um dos idealizadores desta modificação, afirmou, na mesma época, que o metanol, usado como solvente, podia ser substituído, sem nenhum prejuízo para a capacidade de recuperação, por etanol, de mais fácil obtenção e menor preço, no nosso meio (informação verbal). O protocolo assim modificado encontra-se descrito na sessão material e métodos do presente trabalho e representado na figura 2. O etanol foi usado como solvente por Ostner e Heistermann (2003) num estudo da endocrinologia reprodutiva do lemur *Eulemur fulvus rufus* numa concentração, porém, de 100% em vez dos 805 sugeridos por Graham. Ao contrário, Pelletier, Bauman e Festa-Bianchet (2003) extraíram metabólitos de testosterona das fezes do carneiro *Ovis canadensis* com uma solução aquosa com 50% de etanol. Segundo Ziegler e Wittwer (2005), o uso de uma solução aquosa com 30% de álcool, no mínimo, permite que sejam retirados do material fecal, tanto os esteróides livres como os conjugados. Muitos autores submetem as suas amostras a uma extração por agitação em metanol ou etanol, em concentrações variadas, e purificam os extratos obtidos em colunas de separação de marcas variadas, conforme o procedimento descrito em 1997 por Palme et al., para fezes de pôneis, porcos e carneiros. É uma das técnicas

² PEREIRA R.J.G.; POLEGATO, B.F.; SOUZA, S.; NEGRAO, J.A.; DUARTE, J.M.B. Monitoring ovarian cycles and pregnancy in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) by measurement of fecal progesterone metabolites. **Theriogenology**, In press.

³ Informação fornecida por Graham em Jaboticabal em 2001.

sugeridas por Ziegler e Wittwer (2005) para as fezes de primatas, e ela foi empregada por diversas equipes trabalhando com babuínos (LYNCH et al., 2003; WEINGRILL et al., 2004) e outras espécies (STAVISKY et al., 2001). Good, Khan e Lynch (2003) validaram o seu emprego para a extração de corticosteroides das fezes de um pequeno roedor *Peromyscus polionotus*. Apesar do sucesso das técnicas baseadas em solventes pouco tóxicos e pouco poluentes, alguns pesquisadores continuaram preferindo extrações, muitas vezes complexas, com solventes como o éter etílico (BILLITTI; LASLEY; WILSON, 1998), o hexano (MATSUMORO et al., 1999; MIYAMOTO et al., 2001), o dietiléter (BAHR et al., 2000; TAKAHASHI et al., 2002), o diclorometano (PIHL; HAU, 2003), o éter de petróleo (ISOBE et al., 2005; PICKARD et al., 2003). Outros, no entanto, retomaram o protocolo à base de solução tampão descrito por Shideler et al. em 1993, com pequenas variações nas concentrações respectivas do metanol e do surfactante adicionados à solução (BARDI et al., 2003; BARRETT et al., 2002; CAMPBELL et al., 2001; FUJITA et al., 2001; GUDERMUTH et al., 1998; ISOBE; NAKAO, 2004). Ziegler et al. (1998) conseguiam, assim, retirar perto de 90% dos esteóides triciados adicionados às amostras fecais de calitriquídeos antes da extração. Strier e Ziegler (1997) realizaram em paralelo a extração das mesmas amostras com solução tampão e com éter de petróleo e dietiléter, com resultados superiores para esta combinação de solventes (recuperação média de estradiol triciado de 68 e 76% respectivamente). O protocolo com o qual Moriyoshi et al. (1997) extraíram progestinas das fezes de porcas é, com certeza, o menos tóxico e o menos poluente: os autores empregaram água destilada como solvente. Eles não informam, todavia, qual índice de recuperação alcançaram com este

método. Certos esteróides estão presentes nas fezes na forma conjugada ou mesmo multiconjugada com glucuronídeos e/ou sulfatos. Para liberá-los e permitir sua quantificação com os mesmos anticorpos que os hormônios livres, os extratos fecais podem ser submetidos a hidrólise por enzimas específicas como a β -glucuronidase e solvólise pelo ácido sulfúrico (GOYMANN; MOSTL; GWINNER, 2002; LYNCH; ZIEGLER; STRIER, 2002; STRIER; ZIEGLER; WITTWER, 1999; ZIEGLER et al., 1997) .

5 MATERIAL E MÉTODO

5 MATERIAL E MÉTODO

Amostras de fezes das oito espécies envolvidas foram coletadas junto a pesquisadores que estão desenvolvendo projetos com estas mesmas espécies.

5.1. ESPÉCIES E HORMÔNIOS ESTUDADOS

As espécies em questão e os hormônios fecais estudados em cada uma são, em ordem alfabética:

Cabra (<i>Capra hircus</i>)	Progesterona, testosterona
Chimpanzé (<i>Pan troglodytes</i>)	Progesterona, testosterona, cortisol
Cutia (<i>Dasyprocta aguti</i>)	Progesterona, testosterona
Gorila (<i>Gorilla gorilla</i>)	Progesterona, testosterona, cortisol
Hamster Sírio (<i>Mesocricetus auratus</i>)	Progesterona, testosterona, cortisol
Lobo guará (<i>Chrysocyon brachyurus</i>)	Progesterona, testosterona, cortisol
Orangotango (<i>Pongo pygmaeus</i>)	Progesterona, testosterona, cortisol
Ovelha (<i>Ovis aries</i>)	Progesterona, testosterona

5.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Para cada espécie, no intuito de eliminar possíveis variações devidas à diferença na composição e consistência da matriz fecal decorrente do manejo alimentar, da idade, do sexo, das condições sanitárias e reprodutivas dos animais, foi constituído um pool de aproximadamente 100g. Para tal, foram escolhidas amostras de fezes as mais diversas possíveis, tanto quanto ao

animal (idade, sexo, condição reprodutiva), como à data de colheita e à instituição onde ele estava mantido no caso dos chimpanzés e lobos guará. As amostras, até então armazenadas em saquinhos plásticos herméticos individuais em freezer (-20°C), foram descongeladas e uma porção de 0,5 a 5,0g (quantidade fixa para cada espécie, determinada pelo número e volume das amostras originais) de cada uma foi pesada para formação do pool. Os oito pools resultantes foram cuidadosamente homogeneizados com ajuda de um bastão de vidro para os mais úmidos (primatas e lobo guará), num moedor elétrico doméstico para café (Type 505 code 222, Moulinex, França) para as outras espécies (cabra, cutia, hamster, ovelha). No intuito de avaliar eventuais efeitos da liofilização sobre a eficiência dos protocolos de extração, após a homogeneização, 50g, ou seja a metade, de cada um dos pools de fezes de primatas, de lobo guará e de ovelha foram secos num liofilizador a vácuo (Savant Instrument Speedvac Rotary Evaporator, Forma Scientific Inc., OH, EUA) e, a seguir, pulverizados no mesmo moedor. Acondicionadas em recipientes de plástico tampados, de tamanho adequado, as fezes foram então conservadas congeladas até a realização das extrações. A escolha das espécies cujas fezes foram liofilizadas foi motivada pelo teor de umidade alto e heterogêneo das fezes.

5.3 HORMÔNIOS TRICIADOS

A progesterona marcada com trício ($[1,2,6,7,16,17 - ^3\text{H}]$ Progesterone, code TRK641, Amersham®) foi fornecida não diluída pelo Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular (LFEM) do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ – USP. Ela foi diluída em solução tampão $[\text{NaPO}_4$ (13,8g), NaCl (9,0g), azida sódica (1,0g) e água destilada (1000ml), pH 7,0] à medida das nossas necessidades para obtenção de uma solução com radioatividade de aproximadamente 6500 cpm em 100 μl .

A testosterona ($[1,2,6,7 - ^3\text{H}]$ Testosterone, code TRK921, Amersham®) e o cortisol ($[1,2,6,7 - ^3\text{H}]$ Cortisol, code TRK407, Amersham®) triciados foram fornecidos pelo Laboratório de Endocrinologia da Universidade Federal do Estado de São Paulo (UNIFESP), já diluídos e com atividade variando de 2600 a 4400 cpm em 100 μl para a testosterona e de 4000 a 7800 cpm em 100 μl para o cortisol.

5.4 EXTRAÇÃO DOS ESTERÓIDES FECAIS

Os três protocolos descritos a seguir foram testados nas oito espécies, nas fezes úmidas e secas para a recuperação da progesterona e da testosterona. A eficiência de recuperação do cortisol foi avaliada nas fezes de hamster, nas fezes úmidas de lobo guará e nas fezes secas de chimpanzé, de gorila e de orangotango.

5.4.1 Protocolos de Extração Testados

Os protocolos de extração cuja eficiência de recuperação foi avaliada são descritos a seguir:

5.4.1.1 Protocolo 1 (BROWN et al., 1994)

- As amostras de fezes são coletadas, identificadas e armazenadas em freezer (-20°C).
- Após maceração da amostra, 0,5g de fezes úmidas maceradas ou 0,2g de fezes liofilizadas pulverizadas são pesados e transferidos para um tubo (T1) com 5ml de etanol. O conjunto é levado ao banho-maria a 90°C e mantido em ebulição durante 20min, completando o volume para 5ml cada vez que for necessário.
- O tubo é levado à centrífuga (500g) por 15min e a fase líquida transferida para outro tubo (T2). A fase sólida é então ressuspensa em 5ml de etanol e agitada por 30s em agitador do tipo Vortex antes de nova centrifugação por 15min (500g).
- O sobrenadante é então acrescentado ao conteúdo do tubo T2 e evaporado em banho-maria (38°C) sob fluxo de ar.
- Após ter adicionado nos tubos secos 1ml de metanol, eles são agitados num agitador do tipo Vortex por 5min.
- Os tubos hermeticamente fechados são conservados em freezer (-20°C) até o momento de realizar os ensaios.

A figura 1 ilustra esta extração.

Figura 1 - Fluxograma do protocolo 1 (BROWN et al., 1994) de extração de esteróides fecais

5.4.1.2 Protocolo 2 (GRAHAM et al., 2001)

Trata-se de uma adaptação do precedente proposta por Graham et al. (2001).

- 0,5g de fezes úmidas ou 0,2g de fezes liofilizadas são colocados num tubo de vidro com 5ml de etanol 80%.
- Os tubos hermeticamente fechados são agitados suavemente num homogeneizador de sangue (AP22, Phoenix, Araraquara, Brasil) por 15 horas.
- Após centrifugação (500g, 15min), o sobrenadante é passado para outro tubo e conservado a -20°C até a realização dos ensaios.

A figura 2 ilustra esta extração.

5.4.1.3 Protocolo 3 (SCHWARZENBERGER et al., 1991)

- Em um tubo de ensaio são colocados 0,30g de fezes úmidas ou 0,15g de fezes liofilizadas, 2,5ml de água destilada e 2ml de metanol.
- A mistura é agitada suavemente por 30min num homogeneizador de sangue.
- Acrescenta-se, então, 1,5ml de éter de petróleo e a mistura é levada a um agitador tipo Vortex por 30s.
- Após centrifugação (500g, 15min), os tubos são mantidos a -20°C por 30min.
- 1ml da fração de metanol é transferida para outro tubo e mantida em freezer (-20°C) até a realização dos ensaios.

A figura 3 ilustra esta extração.

Figura 2 - Fluxograma do protocolo 2 (GRAHAM et al., 2001) de extração d esteróides fecais

Figura 3 – Fluxograma do protocolo 3 (SCHWARZENBERGER et al., 1991) para extração de esteróides fecais

5.4.2 Procedimento de Extração

Para cada hormônio, cada protocolo de extração foi realizado em oito alíquotas de cada pool. Em cada alíquota foram acrescentados imediatamente após a pesagem 100µl de hormônio triciado, depositados diretamente nas fezes com a ponteira da pipeta. A seguir executou-se o protocolo escolhido nas oito alíquotas.

A diluição no metanol dos extratos secos obtidos na penúltima etapa do protocolo 1 (BROWN et al., 1994) a partir das fezes secas de chimpanzé, gorila e orangotango revelou-se difícil (Figura 4). Foi testada, então, para estas amostras a eficiência de duas etapas suplementares de agitação de 30 minutos cada, a primeira em Vortex, a segunda, mais suave, no homogeneizador.

Figura 4 – Extratos fecais obtidos pelo protocolo 1 após a evaporação sob fluxo de ar. Chimp = chimpanzé, Goril = gorila, Orang = orangotango, Lobo = lobo guará, U = fezes úmidas, S = fezes secas. São Paulo, 2005

5.5 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DOS PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO

A eficiência de cada protocolo de extração é avaliada contando o quanto ele recupera da radioatividade conhecida acrescentada a cada amostra fecal.

5.5.1 Contagem da Radioatividade

Ao contrário das radiações γ , as partículas β não percorrem grandes distâncias após ser emitidas. Elas interagem com o meio, transferindo energia e não atravessam as paredes do tubo no qual se encontra a amostra. Para detectá-las, um transdutor deve ser colocado dentro do tubo: é o líquido de cintilação. Trata-se de um “coquetel” cuja função é de converter a energia cinética da desintegração das partículas radioativas em luz visível que pode ser detectada pelo contador de cintilação. A quantidade de luz emitida no tubo é proporcional à energia das partículas β , ou seja à radioatividade presente na amostra. Diversos fatores como certos agentes químicos ou biológicos (material particulado, células ou membranas celulares) presentes na amostra ou mesmo a cor desta última podem, porém, reduzir esta quantidade de luz, comprometendo a eficiência do processo de cintilação e da contagem (quenching).

5.5.1.1 Contagem nos Extratos Fecais

Para isso, duas alíquotas de 100 μ l de cada extrato foram transferidas para tubos contendo 3ml de líquido de cintilação (Optiphase `Hisafe` 3, Perkin

Elmer, Finlândia) e estes levados para contagem durante cinco minutos no contador de radiação beta (Tri Carb Liquid Scintillation Analyzers 2100TR-Packard Instrument CO., USA) do Laboratório de Endocrinologia do Tecido Adiposo do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Na mesma ocasião, eram levados ao contador dois tubos com 100 μ l de hormônio marcado, também diluídos em 3ml de líquido de cintilação, para determinação da atividade em cpm do hormônio acrescentado nas fezes.

Para avaliar quanto da radioatividade mensurada provinha de fontes externas ao extrato fecal (contaminações ambientais diversas, ruído do detector cromatográfico), um total de 14 tubos-controle contendo unicamente líquido de cintilação (“blank”) foram levados ao contador ao longo do experimento. A média das contagens em cpm obtidas com esses tubos “blanks” foi subtraída das contagens obtidas para cada amostra.

5.5.1.2 Controle da Proporcionalidade da Leitura

Um dos critérios para a verificação da confiabilidade das medidas foi a proporcionalidade de resposta do detector. Ela foi avaliada levando-se ao contador três séries de duas vezes 10 tubos, uma série para cada hormônio, contendo respectivamente 1 μ l, 3 μ l, 5 μ l, 7 μ l, 10 μ l, 20 μ l, 40 μ l, 60 μ l, 80 μ l e 100 μ l de hormônio triciado e o volume necessário de líquido de cintilação para completar um volume total de 3ml.

A proporcionalidade da leitura foi também avaliada para cada um dos três hormônios em cada um dos 39 extratos fecais. Para isto, foram levadas ao contador séries de 5 tubos contendo respectivamente 1 μ l, 3 μ l, 5 μ l, 7 μ l, 10 μ l de

hormônio triciado e o volume necessário de líquido de cintilação para completar um volume total de 3ml, acrescentando-se em cada um 100µl de extrato fecal obtido sem adição prévia de hormônio marcado.

5.5.1.3 Exatidão

A exatidão ou acurácia de um processo de mensuração é a concordância entre o valor real da grandeza a ser medida (radioatividade no extrato) e o valor estimado pelo contador. De acordo com Chasin, Chasin e Salvadori (1994) o coeficiente de exatidão pode ser calculado por meio da seguinte fórmula:

$$Exatidão (\%) = \left(1 - \frac{| \text{valor real} - \text{valor medido} |}{\text{valor real}} \right) \times 100$$

Para a determinação da exatidão, amostras de fezes úmidas e eventualmente de fezes secas de cada espécie foram extraídas usando-se cada um dos três protocolos, porém sem adição prévia de hormônio triciado. A seguir, foram levados ao contador tubos contendo respectivamente 0µl e 100µl de extrato aos quais foram acrescentados 10µl de hormônio marcado e o volume necessário de líquido de cintilação para completar um volume total de 3ml. As contagens obtidas para estes dois tubos correspondem respectivamente ao valor real e ao valor estimado no extrato.

5.5.1.4 Teste de diluição da cor

Para avaliar o efeito da cor dos extratos sobre a contagem da radioatividade foram levados ao contador tubos contendo respectivamente 0 μ l, 20 μ l, 40 μ l, 60 μ l, 80 μ l e 100 μ l de extrato de fezes de cabra obtido com o protocolo 1, 10 μ l de progesterona triciada e o volume necessário de líquido de cintilação para completar um volume total de 3ml.

A existência de uma eventual correlação entre as medidas de volume de extrato e as contagens correspondentes foi verificada pela análise de regressão linear.

5.5.2 Cálculo da Porcentagem de Recuperação

A porcentagem de recuperação foi calculada para cada alíquota pela comparação da atividade média obtida após a extração com a atividade teórica (não extraída) aplicando-se a fórmula seguinte:

$$\text{Porcentagem} = \frac{\text{Atividade em cpm do extrato} \times \text{Volume total do extrato } (\mu\text{l})}{\text{Atividade em cpm de } 100\mu\text{l de hormônio marcado}}$$

Ou seja, para cada protocolo:

$$\text{Protocolo 1} \quad \% = \frac{\text{cpm extrato} \times 1000}{\text{cpm total}}$$

$$\text{Protocolo 2} \quad \% = \frac{\text{cpm extrato} \times 5000}{\text{cpm total}}$$

$$\text{Protocolo 3} \quad \% = \frac{\text{cpm extrato} \times 4500}{\text{cpm total}}$$

Neste último caso, considera-se como extrato a fração de 4,5ml da solução de metanol e água na qual são realizadas as dosagens.

5.4 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Além da análise estatística dos resultados numéricos, as características de cada método também foram discutidas.

5.6.1 Análise estatística

Uma análise de regressão linear foi efetuada para avaliação da proporcionalidade da leitura pelo coeficiente de correlação linear de Pearson obtido (r^2).

Os coeficientes de exatidão das contagens foram considerados satisfatórios quando compreendidos entre 80 e 120% (CHASIN; CHASIN; SALVADORI, 1994).

Para cada espécie e cada hormônio, foram calculados as médias e respectivos desvios padrões das porcentagens de recuperação alcançadas em oito repetições por cada protocolo. As porcentagens médias obtidas pelos três protocolos para um mesmo hormônio na mesma espécie foram comparadas entre si por um teste de ANOVA, assim como as médias obtidas nas fezes

úmidas e secas de uma mesma espécie pelo mesmo protocolo, para o mesmo hormônio.

A precisão e repetibilidade destes resultados foram avaliadas calculando os seus coeficientes de variação ou desvios padrões relativos por meio da seguinte fórmula matemática:

$$\text{Coeficiente de variação (\%)} = \frac{\text{Desvio padrão} \times 100}{\text{Recuperação média determinada}}$$

Coeficientes de variação inferiores ou iguais a 15% foram considerados satisfatórios (CHASIN; CHASIN; SALVADORI, 1994). Procedeu-se à análise da variância (ANOVA) entre os três conjuntos de coeficientes de variação.

Uma análise de regressão linear avaliou a correlação entre as porcentagens de recuperação obtidas por cada protocolo e os coeficientes de exatidão das contagens correspondentes.

5.6.2 Outros aspectos

Características tais como o número de etapas constantes de cada protocolo, o tempo necessário a sua realização, o seu custo, a toxicidade dos reagentes envolvidos também foram discutidas e levadas em conta na avaliação das três metodologias.

6 RESULTADOS

Os resultados obtidos são apresentados a seguir.

6.1 RADIOATIVIDADE NOS TUBOS-CONTROLE (BLANK)

O contador de radiação β detectou nos 14 tubos-controle que continham somente líquido de cintilação, sem hormônio triciado nem extrato fecal, uma atividade média de $14,55 \pm 3,59\text{cpm}$.

6.2 PROPORCIONALIDADE DA LEITURA

A análise de regressão linear evidenciou a estreita correlação entre as medidas crescentes de volume de cada hormônio e as contagens de atividade em cpm correspondentes no líquido de cintilação, com $r^2 = 0,994$ ($F = 12607$) para a progesterona, $r^2 = 0,995$ ($F = 17460$) para o cortisol e $r^2 = 0,994$ ($F = 14346$) para a testosterona e $p < 0,0001$ para os três hormônios. Ficou assim confirmada a proporcionalidade das leituras efetuadas pelo detector no líquido de cintilação.

Resultado semelhante foi obtido com os testes de leitura efetuados nos extratos fecais. A significância da correlação entre as medidas crescentes de volume de cada hormônio e as contagens de atividade em cpm correspondentes no líquido de cintilação foi demonstrada pela análise de regressão linear com $p < 0,05$ para os 93 testes.

6.3 EXATIDÃO

A tabela 1 mostra os coeficientes de exatidão das contagens realizadas em cada tipo de extrato fecal para cada hormônio. Os coeficientes compreendidos entre 80 e 120% aparecem em negrito.

Tabela 1 – Coeficientes de exatidão da contagem em cpm da radioatividade de três hormônios triciados em extratos fecais obtidos por três protocolos de extração nas fezes de oito espécies. São Paulo, 2005

Espécie	Progesterona			Cortisol			Testosterona		
	Prot. 1 - %	Prot. 2 - %	Prot. 3 - %	Prot. 1 - %	Prot. 2 - %	Prot. 3 - %	Prot. 1 - %	Prot. 2 - %	Prot. 3 - %
Hamster	73,12	90,80	85,81	72,17			73,88	77,59	73,14
Cutia	76,29	92,86	94,97				64,50	83,53	78,04
Cabra	13,00	67,76	93,73				20,39	53,50	89,37
Chimp.U	41,65	97,90	94,28				27,19	59,99	79,60
Chimp.S	27,23	91,14	89,16	28,60	72,58		43,09	58,87	93,88
Gorila U	28,51	79,78	82,65				28,49	66,83	89,98
Gorila S	8,79	72,79	74,49	4,67	66,23		40,65	57,76	78,07
Orang.U	21,19	83,05	77,90				21,73	60,33	91,76
Orang.S	14,99	50,58	97,69	10,63	69,73		16,39	55,60	87,70
Lobo U	74,64	89,41	94,69	57,89			57,44	76,18	92,21
Lobo S	57,56	82,06	94,72				54,53	76,40	75,74
Ovelh.U	24,42	79,62	95,17				33,90	73,55	79,86
Ovelh.S	15,08	85,18	84,97				35,99	75,20	80,86

Prot. 1, 2, 3 = Protocolo 1, 2, 3. Chimp. = Chimpanzé, Orang. = Orangotango, Lobo = Lobo guará, Ovelh. = Ovelha, S = Fezes secas, U = Fezes úmidas.

6.4 TESTE DE EFEITO DA COR

A tabela 2 mostra as contagens em cpm obtidas na leitura de tubos contendo 10 μ l de progesterona triciada e um volume crescente de extrato de fezes de cabra obtido pelo protocolo 1 de Brown.

Tabela 2 – Radioatividade em cpm dentro de seis tubos contendo respectivamente 0 μ l, 20 μ l, 40 μ l, 60 μ l, 80 μ l e 100 μ l de extrato de fezes de cabra obtido com o protocolo 1 (BROWN et al, 1994), 10 μ l de progesterona triciada e o volume necessário de líquido de cintilação para completar um volume total de 3ml. São Paulo, 2005

Volume de Extrato (μ l)	0	20	40	60	80	100
Contagem em cpm	668,01	344,28	236,66	155,92	114,41	86,83

A análise de regressão linear evidenciou uma correlação significativa entre os dois conjuntos de valores ($r^2 = 0,8188$, $p = 0,0131$). Esta relação está representada graficamente na figura 5.

Figura 5 – Representação gráfica da relação entre a radioatividade medida em cpm em tubos contendo 10 μ l de progesterona triciada em um volume crescente de extrato de fezes de cabra obtido com o protocolo 1 de Brown et al (1994) e os valores em μ l deste volume. São Paulo, 2005

6.5 PORCENTAGENS DE RECUPERAÇÃO

As porcentagens de recuperação alcançadas por cada protocolo para cada hormônio nas fezes de cada espécie são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 3 – Porcentagens médias $\pm$ dp de recuperação de hormônios triados alcançadas por três protocolos de extração de esteróides fecais nas fezes de oito espécies. São Paulo, 2005

Espécie	Progesterona			Cortisol			Testosterona		
	Prot. 1 - %	Prot. 2 - %	Prot. 3 - %	Prot. 1 - %	Prot. 2 - %	Prot. 3 - %	Prot. 1 - %	Prot. 2 - %	Prot. 3 - %
Hamster	62,7 ^a $\pm$ 5,3	83,7 ^b $\pm$ 12,0	61,8 ^a $\pm$ 4,90	70,4 ^a $\pm$ 0,7	91,1 ^b $\pm$ 5,2	90,9 ^b $\pm$ 5,0	73,2 ^a $\pm$ 4,3	87,9 ^b $\pm$ 11,6	70,2 ^a $\pm$ 9,2
Cutia	59,9 ^a $\pm$ 2,5	84,1 ^b $\pm$ 16,9	150,9 ^c $\pm$ 15,1				68,1 ^a $\pm$ 3,3	107,3 ^b $\pm$ 13,5	81,6 ^c $\pm$ 11,2
Cabra	9,2 ^a $\pm$ 0,6	64,6 ^b $\pm$ 3,1	114,0 ^c $\pm$ 30,0				12,1 ^a $\pm$ 1,1	103,7 ^b $\pm$ 13,7	112,6 ^b $\pm$ 29,4
Chimp. U	34,0 ^{ax} $\pm$ 1,2	105,9 ^{bx} $\pm$ 8,3	57,0 ^{cx} $\pm$ 2,9				40,7 ^{ax} $\pm$ 3,9	96,1 ^{bx} $\pm$ 5,8	89,5 ^{bx} $\pm$ 6,1
Chimp. S	33,2 ^{ax} $\pm$ 4,3	93,8 ^{by} $\pm$ 4,1	56,1 ^{cy} $\pm$ 5,0	49,9 ^a $\pm$ 15,8	121,3 ^b $\pm$ 12,9	117,1 ^b $\pm$ 21,6	32,0 ^{ay} $\pm$ 4,3	100,3 ^{bx} $\pm$ 13,7	76,9 ^{cy} $\pm$ 2,8
Gorila U	19,5 ^{ax} $\pm$ 1,8	93,8 ^{bx} $\pm$ 6,7	51,7 ^{cx} $\pm$ 7,9				20,6 ^{ax} $\pm$ 2,7	90,0 ^{bx} $\pm$ 7,8	95,0 ^{bx} $\pm$ 2,7
Gorila S	17,1 ^{ay} $\pm$ 2,0	86,0 ^{bx} $\pm$ 8,4	56,2 ^{cx} $\pm$ 5,8	22,6 ^a $\pm$ 2,4	110,2 ^b $\pm$ 3,7	142,9 ^c $\pm$ 20,9	14,7 ^{ay} $\pm$ 1,9	103,9 ^{by} $\pm$ 9,8	78,5 ^{cy} $\pm$ 5,5
Orang. U	13,4 ^{ax} $\pm$ 1,5	105,2 ^{bx} $\pm$ 7,0	57,4 ^{cx} $\pm$ 5,9				13,5 ^{ax} $\pm$ 1,4	87,4 ^{bx} $\pm$ 7,5	90,0 ^{bx} $\pm$ 5,0
Orang. S	15,4 ^{ax} $\pm$ 3,0	79,2 ^{by} $\pm$ 4,8	47,4 ^{cy} $\pm$ 3,5	15,8 ^a $\pm$ 1,3	95,1 ^b $\pm$ 8,8	116,1 ^c $\pm$ 5,0	8,1 ^{ay} $\pm$ 0,9	96,3 ^{bx} $\pm$ 16,9	83,1 ^{cy} $\pm$ 5,1
Lobo U	51,9 ^{ax} $\pm$ 2,8	114,9 ^{bx} $\pm$ 16,3	61,8 ^{ax} $\pm$ 6,3	32,6 ^a $\pm$ 3,9	97,1 ^b $\pm$ 6,5	133,8 ^c $\pm$ 9,2	58,7 ^{ax} $\pm$ 4,0	117,9 ^{bx} $\pm$ 12,3	118,9 ^{bx} $\pm$ 9,4
Lobo S	45,9 ^{ay} $\pm$ 1,5	88,8 ^{by} $\pm$ 5,6	62,7 ^{cx} $\pm$ 4,0				51,4 ^{ay} $\pm$ 2,6	97,2 ^{by} $\pm$ 5,6	84,4 ^{cy} $\pm$ 4,3
Ovelh. U	22,8 ^{ax} $\pm$ 1,4	73,7 ^{bx} $\pm$ 6,0	50,8 ^{cx} $\pm$ 4,6				24,7 ^{ax} $\pm$ 1,4	75,3 ^{bx} $\pm$ 5,1	77,2 ^{bx} $\pm$ 10,9
Ovelh. S	19,5 ^{ay} $\pm$ 1,9	80,5 ^{bx} $\pm$ 10,1	40,8 ^{cy} $\pm$ 6,1				21,9 ^{ay} $\pm$ 0,9	78,8 ^{bx} $\pm$ 7,9	77,0 ^{bx} $\pm$ 3,7

Prot. 1, 2, 3 = Protocolo 1, 2, 3. Chimp. = Chimpanzé, Orang. = Orangotango, Lobo = Lobo guará, Ovelh. = Ovelha, S = Fezes secas, U = Fezes úmidas. Para cada espécie, tipo de fezes e hormônio, sobrescritos diferentes (a, b, c) indicam diferença significativa entre as médias alcançadas pelos três protocolos (ANOVA, $p < 0,05$). Para uma mesma espécie, o mesmo hormônio e o mesmo protocolo, sobrescritos (x, y) diferentes indicam diferença significativa entre as médias obtidas em fezes secas e úmidas (ANOVA, $p < 0,05$).

6.6 PRECISÃO

A tabela 3 mostra os coeficientes de variação das porcentagens de recuperação obtidas em cada tipo de extrato fecal, para cada hormônio, por cada um dos três protocolos repetido oito vezes. Os coeficientes inferiores a 15% aparecem em negrito.

Tabela 4 – Coeficientes de variação das porcentagens de recuperação de três hormônios triciados obtidas por três protocolos de extração nas fezes de oito espécies. São Paulo, 2005

Espécie	Progesterona			Cortisol			Testosterona		
	Prot. 1 - %	Prot. 2 - %	Prot. 3 - %	Prot. 1 - %	Prot. 2 - %	Prot. 3 - %	Prot. 1 - %	Prot. 2 - %	Prot. 3 - %
Hamster	8,53	14.33	7.92	1.08	5.76	5.56	5.85	13.24	13.15
Cutia	4,16	20.12	10.02				4.80	12.55	13.69
Cabra	6.40	4.85	26.27				8.92	13.26	26.08
Chimp.U	3.47	7.80	5.10				9.47	6.00	6.78
Chimp.S	12.92	4.42	9.00	31.68	10.66	18.83	13.42	13.66	3.67
Gorila U	9.32	7.14	15.24				13.11	8.67	2.59
Gorila S	11.52	9.74	10.26	10.42	3.32	14.60	12.64	9.46	6.99
Orang.U	11.08	6.68	10.29				10.52	8.53	5.61
Orang.S	19.68	6.05	7.34	8.53	9.21	4.31	11.53	17.52	6.13
Lobo U	5.37	14.16	10.20	12.06	6.67	6.87	7.66	10.43	7.93
Lobo S	3.33	6.33	6.40				5.08	5.73	5.12
Ovelh.U	6.24	8.15	9.03				5.83	6.74	14.07
Ovelh.S	9.76	12.60	15.01				2.64	10.00	4.87

Prot. 1, 2, 3 = Protocolo 1, 2, 3. Chimp. = Chimpanzé, Orang. = Orangotango, Lobo = Lobo guará, Ovelh. = Ovelha, S = Fezes secas, U = Fezes úmidas.

A análise da variância (ANOVA) entre os três conjuntos de dados não evidenciou nenhuma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,8641$) entre eles.

6.7 CORRELAÇÃO ENTRE PORCENTAGENS DE RECUPERAÇÃO E COEFICIENTES DE EXATIDÃO DAS CONTAGENS

A análise de regressão linear evidenciou uma estreita correlação entre as porcentagens de recuperação obtidas com o protocolo 1 de Brown e os coeficientes de exatidão das contagens correspondentes ($r^2 = 0,7495$, $p < 0,0001$) (Figura 6). Nos testes efetuados com os protocolos 2 (GRAHAM et al, 2001) e 3 (SCHWARZENBERGER et al, 1991), não houve correlação significativa entre esses dois conjuntos de valores ($r^2 = 0,001$, $p = 0,8724$ e $r^2 = 0,028$, $p = 0,4142$ respectivamente).

Figura 6 – Representação gráfica da correlação linear entre as porcentagens de recuperação alcançadas com o protocolo 1 e os coeficientes de exatidão das contagens de radioatividade correspondentes efetuadas no contador de radiação β

6.8 RECUPERAÇÃO DA PROGESTERONA NAS FEZES DE CHIMPANZÉ GORILA E ORANGOTANGO PELO PROTOCOLO 1 DE BROWN MODIFICADO

As porcentagens médias de recuperação da progesterona triciada obtidas nas fezes secas de chimpanzé, gorila e orangotango pelo protocolo 1 sem e com modificação são apresentadas na tabela 4. A análise estatística constatou uma diferença significativa entre as porcentagens médias obtidas nas fezes de gorila (Unpaired t test, $p = 0,0130$) sugerindo uma porcentagem média de recuperação superior para o protocolo original.

Tabela 5 – Porcentagens médias de recuperação ($\pm$ dp) de progesterona triciada pelo protocolo 1 com e sem modificação nas fezes secas de chimpanzé, gorila e orangotango. São Paulo, 2005

Espécie	Sem modificação (%)	Com modificação (%)
Chimpanzé	33,21 $\pm$ 4,29 ^a	34,58 $\pm$ 2,97 ^a
Gorila	20,56 $\pm$ 2,82 ^b	17,10 $\pm$ 1,97 ^c
Orangotango	15,45 $\pm$ 3,04 ^d	15,77 $\pm$ 2,45 ^d

Numa mesma linha, sobrescritos diferentes indicam diferença significativa entre as duas médias (Unpaired t test, $p < 0,05$).

7 DISCUSSÃO

Uma rápida leitura da tabela 4 mostra que dentre as 97 porcentagens de recuperação determinadas pela nossa análise, somente nove (ou seja 9,28%), das quais duas para o protocolo 1 de Brown, duas para o protocolo 2 de Graham e cinco para o protocolo 3 de Schwarzenberger, não alcançaram o nível de precisão considerado como satisfatório por Chasin, Chasin e Salvadori (1994). A dispersão destes valores, pouco precisos, entre as diversas espécies e os diversos hormônios e protocolos não permite que lhes seja atribuída uma causa específica e sugere, ao contrário, um caráter accidental. Nenhuma diferença significativa foi detectada entre os três conjuntos de coeficientes de variação pela análise estatística (ANOVA). Estes dados evidenciam a homogeneidade e a repetibilidade dos resultados obtidos pelos métodos de extração testados e, em particular, pelos protocolos 1 e 2.

O protocolo 1 foi utilizado com sucesso por diversos autores que obtiveram com ele altas taxas de recuperação. Tal é o caso, por exemplo, de Brown et al. (1994) recuperando acima de 90% da progesterona marcada com carbono 14 acrescentada a fezes de diversas espécies de felinos. Em 2004, Young et al. obtinham uma taxa de recuperação de cortisol triciado superior a 80% nas fezes de felinos e de furão. Para a testosterona, este mesmo protocolo forneceu índices de 86,6% nas fezes de bugio (*Alouatta caraya*) (MORELAND et al., 2001) e de 79,7% em eqüidna (*Tachyglossus aculeatus*) um mamífero monotremado da Austrália (OATES et al., 2002). No nosso meio, este protocolo talvez seja o mais comumente usado e, em diversos estudos envolvendo várias espécies de felinos brasileiros, ele alcançou uns índices de

recuperação próximos a 80% ou mesmo superiores (BERBARE, 2004; MORAIS et al., 2002; MORATO et al., 2004_a; MORATO et al., 2004_b; MOREIRA et al., 2001; VIAU, 2004). Wasser et al. (2000) compararam a eficiência dos protocolos 1 de Brown e 2 de Graham para extrair progesterona e cortisol triciados das fezes de diversas espécies de mamíferos e de aves. As porcentagens de recuperação obtidas, bastante similares, sempre superiores a 85% para os dois hormônios, levaram os autores a considerar as duas metodologias como equivalentes. Os nossos resultados, apresentados na tabela 3, sugerem outra realidade para as nossas condições laboratoriais. De fato, as taxas de recuperação alcançadas com o protocolo 1 variam de $9,2 \pm 0,6\%$ a $73,2 \pm 4,3\%$. Ademais, ainda que em três casos, que são a extração da progesterona e da testosterona triciadas das fezes de hamster Sírio e a extração da progesterona triciada das fezes úmidas de lobo guará, as porcentagens médias de recuperação alcançadas pelos protocolos 1 e 3 não apresentem diferença significativa do ponto de vista estatístico, nos outros 94 testes, a análise estatística sugere uma eficiência muito menor do protocolo 1 em relação aos dois outros. No que diz respeito a estes, os dados apresentados na tabela 3 sugerem uma razoável variabilidade da sua eficiência em função da espécie e do hormônio. Foram obtidas, com o protocolo 2 porcentagens de recuperação situadas entre $64,6 \pm 3,1\%$ e $121,3 \pm 12,9\%$. Já os índices alcançados pelo protocolo 3 variaram de $40,8 \pm 6,1\%$ até $142,9 \pm 20,9\%$. As taxas de recuperação da progesterona triciada pelo protocolo 2 foram superiores às aquelas obtidas com o uso do protocolo 3 em seis das oito espécies, tanto nas fezes úmidas como nas fezes liofilizadas. Nas fezes de cabra e de cutia, no entanto, o método 3 recuperou melhor esse hormônio. O

protocolo 2 apresentou também um melhor desempenho na extração da testosterona triciada, com porcentagens de recuperação significativamente maiores em seis dos 13 testes e equivalentes nos sete outros. Já o protocolo 3 recuperou melhor o cortisol triciado, levando à obtenção de porcentagens significativamente mais altas nas fezes de gorila, orangotango e lobo guará, e superiores, porém sem diferença estatisticamente significante, no hamster Sírio e no chimpanzé.

Causa perplexidade a conclusão, aparentemente paradoxal, que parecem sugerir os dados expostos acima, ou seja o medíocre valor do protocolo 1 (BROWN et al., 1994) de extração de esteróides fecais que aparece como muito pouco eficiente apesar de preciso. Todavia, o mesmo vem sendo empregado, às vezes com algumas adaptações, em diversos laboratórios por pesquisadores de competência reconhecida fornecendo resultados valiosos para o monitoramento das funções reprodutivas ou o acompanhamento da resposta endócrina ao estresse num número cada vez maior de espécies (BROWN et al., 1994; CRICHTON et al., 2003; FOLEY; PAPAGEORGE; WASSER, 2001; HARPER; AUSTAD, 2001; HAYSSEN; HARPER; DEFINA, 2002; MORAIS et al., 2002; MORATO et al., 2004_a; MORATO et al., 2004_b; MOREIRA et al., 2001; MORELAND et al., 2002; OATES et al., 2002; THOMPSON; MASHBURN; MONFORT, 1998; THOMPSON; MONFORT, 1999; WASSER et al., 2000; YOUNG et al., 2004). No próprio Laboratório de Dosagens Hormonais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, onde este trabalho foi realizado, ele era até pouco tempo atrás o método de eleição para extração de esteróides fecais e permitiu, entre outros trabalhos importantes, o estudo do ciclo estral do gato-mourisco

(*Herpailurus yagouarundi*) (BERBARE, 2004), do ciclo estral e da resposta ao estresse do hamster Sírio (*Mesocricetus auratus*) (CHELINI et al., 2005, CHELINI et al., in press¹), da puberdade e início da ciclicidade ovariana da onça pintada (*Panthera onca*) (VIAU, 2004), da resposta endócrina ao estresse de machos da mesma espécie (MORATO et al., 2004_a), do perfil endócrino ao longo da gestação da cabra doméstica (CAPEZZUTO, 2005), dos efeitos do enriquecimento ambiental sobre o perfil endócrino do lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*) em cativeiro (VASCONCELLOS, 2004).

A interpretação dos dados requer, porém, uma certa cautela. A tabela 1 apresenta os coeficientes de exatidão das nossas medidas. Lembrando que a exatidão de uma análise é a concordância entre o valor real da substância (no nosso caso a atividade em cpm do hormônio marcado) na amostra (extrato fecal) e o estimado pelo processo analítico, é obvio que quanto mais perto de 100 o coeficiente, maior a exatidão e mais confiável a medida, aceitando-se uma variação máxima de 20%, ou seja coeficientes de variação compreendidos entre 80 e 120% (CHASIN; CHASIN; SALVADORI, 1994). A tabela 1 mostra que nenhuma das 31 medidas de radioatividade efetuadas nos extratos obtidos pelo protocolo 1 e somente nove daquelas executadas nos extratos obtidos com o protocolo 2 preenchem essa condição. Os resultados obtidos com o protocolo 3 são os mais exatos com 18 coeficientes sobre 26 podendo ser considerados como satisfatórios. Significativamente, a análise de regressão linear evidenciou uma estreita correlação entre as porcentagens de recuperação e os coeficientes de exatidão dos testes realizados com o

¹ CHELINI, M.O.M.; SOUZA, N.L.; CORTOPASSI, S.R.G.; FELIPPE, E.C.G., OLIVEIRA, C.A. Assessement of the physiological stress response by quantification of fecal corticosteroids. **Contemporary Topics in Laboratory Animal Science**, In press.

protocolo 1 de Brown. Parece possível, então, que a explicação dos resultados pouco expressivos atribuídos, neste trabalho, ao protocolo 1 resultem, na realidade, não do método em si, cujo valor já foi amplamente demonstrado, e sim de medição inadequada. Os testes realizados, tanto no líquido de cintilação puro, quanto no mesmo acrescentado de 100 μ l dos diversos extratos, demonstraram a linearidade das leituras efetuadas pelo contador, e permitem afastar a eventualidade de uma calibração incorreta do aparelho. Todavia, mesmo num aparelho adequadamente calibrado como o que nós usamos, a eficiência da contagem pode ser afetada por fatores inerentes à própria amostra num fenômeno conhecido como *quenching*. A presença de material particulado ou de restos celulares, de agentes químicos como oxigênio dissolvido, água ou outros solventes pode ser um fator de *quenching*, como também a cor da amostra. O líquido de cintilação emite luz na região azul do espectro luminoso. As cores vermelha, verde e amarela, dentro do tubo de cintilação, absorvem esta luz, reduzindo a eficiência da contagem (STEINER, 1996). As figuras 7 e 8 mostram alguns dos extratos fecais fornecidos pelos protocolos 1 e 2 e evidenciam a diferença de coloração existente entre eles. A coloração de um extrato fecal varia com os componentes da própria matéria fecal, os quais, por sua vez, dependem em grande parte do regime alimentar do animal. Os extratos obtidos a partir das fezes do hamster sírio, animal de laboratório alimentado com ração específica para roedores, exibem, por exemplo, uma coloração amarelo claro. Em contraste, a cor dos extratos de fezes de cabras alimentadas quase exclusivamente com capim é verde escuro.

A tabela 2 e a figura 5 mostram claramente o efeito da concentração do extrato sobre a medição da radioatividade da amostra pelo contador.

Figura 7 – Extratos fecais obtidos pelo protocolo 1 antes evaporação sob fluxo de ar. Chimp = chimpanzé, Goril = gorila, Orang = orangotango, Lobo = lobo guará, U = fezes úmidas, S = fezes secas. São Paulo, 2005

Figura 8 – Extratos fecais obtidos pelo protocolo 2

As leituras em cpm da radioatividade de um volume constante de hormônio triciado, que deveriam ser todas, senão iguais, pelo menos bem próximas, variam em função do volume de extrato presente no tubo de cintilação, diminuindo à medida que este volume aumenta. Isto sugere um efeito de “color quench” importante, que poderia explicar os baixos coeficientes de exatidão das nossas contagens. Parece provável que os nossos resultados subestimem a real eficiência dos protocolos testados e, em particular, do protocolo 1 que fornece extratos muito mais concentrados e conseqüentemente de cor mais acentuada do que os dois outros. A aplicação do princípio de cálculo da recuperação tal qual enunciado por Chasin, Chasin e Salvadori (1994, p. 51) teria contornado este problema. Segundo estes autores:

A recuperação será calculada pela comparação da concentração média obtida por interpolação (extraída), com a concentração teórica (não extraída). [...]. Neste caso (medição da concentração teórica), a substância em análise será adicionada ao extrato final obtido.

A porcentagem de recuperação seria, então, calculada não sobre o valor real da radioatividade acrescentada nas fezes, medida no líquido de cintilação e, sim, sobre seu valor estimado pelo contador em 100µl de extrato fecal obtido sem hormônio triciado. A contagem da concentração teórica e a contagem da concentração resultante da extração seriam feitas nas mesmas condições e sua comparação seria facilitada.

A modificação do protocolo 1 de Brown, visando a uma melhor solubilização dos resíduos aderidos à parede do tubo de ensaio após a secagem no fluxo de ar, não trouxe os resultados esperados. Como mostra a tabela 5, não houve diferença significativa estatisticamente entre as porcentagens de recuperação

obtidas pelo protocolo modificado e o protocolo original nas fezes de chimpanzé e de orangotango. A única diferença significativa foi observada nas fezes de gorila, onde o protocolo original se mostrou mais eficiente do que o protocolo modificado.

A extração da testosterona triciada pelo protocolo 2 de Graham foi mais eficiente nas fezes liofilizadas de gorila do que nas fezes úmidas da mesma espécie. Em dez dos outros testes, não houve diferença significativa entre as porcentagens de recuperação dos hormônios triciados obtidas nas fezes secas e nas fezes úmidas, e nos 19 testes restantes a análise estatística sugere maior eficiência da extração nas fezes úmidas. Não se deve inferir a partir destes resultados que o mesmo ocorra na extração dos metabólitos de hormônios esteróides naturalmente presentes nas fezes. Convém lembrar que nós medimos a capacidade de recuperação de hormônios exógenos acrescentados às fezes antes da extração. As fezes liofilizadas sendo pulverizadas, a superfície de contato do hormônio com a matéria fecal é superior àquela oferecida pelas fezes úmidas. Isso pode fazer com que o esteróide seja mais facilmente removido das fezes úmidas. Além disso, as interações físico-químicas dos metabólitos hormonais endógenos com os solventes empregados nos diversos processos de extração, não são necessariamente idênticas àquelas que ocorrem entre estes mesmos solventes e as moléculas do hormônio acrescentado às fezes antes da extração. Talvez esta seja a maior limitação das tentativas de avaliação da eficiência de um protocolo de extração. O que é avaliado, na realidade, é como ele recupera um hormônio exógeno acrescentado a fezes já excretadas e não os metabólitos do mesmo hormônio, às vezes conjugados, excretados pelo organismo. Outra

difficuldade reside na heterogeneidade das amostras fecais, resultante das características metabólicas de cada indivíduo e de condições ambientais como diferenças no manejo, tanto alimentar como sanitário, dos animais estudados. Alguns procedimentos como a liofilização, ou mesmo o descarte de amostras provenientes de animais conhecidamente doentes, podem ajudar a limitar os efeitos desta heterogeneidade. Não se pode afirmar, todavia, que ela não exerça influência sobre a eficiência da recuperação.

A capacidade de recuperação é, sem sombra de dúvida, determinante na escolha de uma técnica de extração de hormônios fecais e, tanto o seu valor numérico, como a sua repetibilidade, devem ser cuidadosamente avaliados. Outros aspectos, no entanto, devem ser levados em consideração, tais como a praticidade de uma metodologia, o seu custo ou o fato de ela requerer, ou não, o uso, a manipulação e o descarte de substâncias potencialmente tóxicas e poluentes.

Quanto a este último aspecto, o protocolo descrito por Brown et al. (1994) usa como solvente o etanol e o metanol. Este último álcool, bastante tóxico, não é empregado na modificação sugerida por Graham et al. (2001). Além do metanol, a metodologia desenvolvida por Schwarzenberger et al. (1991) requer o uso do éter de petróleo o qual, além de tóxico e inflamável como os dois álcoois, libera ao consumir-se gases altamente tóxicos como o mono e o dióxido de carbono. Ele representa portanto uma ameaça relativamente severa para o meio-ambiente e seu descarte, no laboratório, é problemático.

A praticidade de uma metodologia pode ser avaliada pelo número de etapas envolvidas na sua realização e exigindo a intervenção do técnico. Além da preparação da solução inicial de fezes e solvente, comum aos três

protocolos, constam do protocolo 1 (BROWN et al., 1994) uma etapa de ebulição de 20min que o técnico deve acompanhar de perto para manter o nível de etanol em 5ml, duas centrifugações intercaladas com a pipetagem de uma nova dose de etanol e 30sec de agitação no vórtex antes da retirada meticulosa, para não haver nenhuma perda de esteróides em solução, de toda a fase líquida para posterior secagem. Esta se processa no fluxo de ar e demora de duas a seis horas aproximadamente dependendo da espécie animal. Ela deve ser cuidadosa e o fluxo de ar moderado para evitar projeções que representariam perda de material. Segue-se a dissolução, por agitação no vórtex durante 5 min, do extrato seco em 1ml metanol cuidadosamente medido, e o armazenamento da solução.

A técnica de Schwarzenberger et al. (1991) é mais simples. Após a preparação da solução inicial, esta é agitada 30min, acrescida de éter de petróleo, agitada de novo e centrifugada uma vez. Ela pode ser realizada em 2h aproximadamente contando com o tempo de repouso no freezer para melhor separação das fases de éter e de metanol. A aspiração da fração de metanol que contém a maioria dos esteróides requer cuidado para não haver contaminação pelo éter de petróleo mas não precisa ser total, já que o seu volume é conhecido, permitindo que a quantidade de esteróides por grama de fezes seja deduzida da medida da concentração no metanol por uma simples regra de três.

A metodologia descrita por Graham et al. (2001) se desenvolve em duas etapas somente: a agitação suave no homogeneizador, longa mas sem intervenção do experimentador, e uma centrifugação. O extrato obtido pode ser simplesmente despejado nos tubos de armazenamento, se for o caso, sem

maiores cuidados já que seu volume é conhecido. Trata-se, portanto, do protocolo mais simples apesar do tempo exigido. Convém notar, ademais, que, além de tubos de vidro com tampa e de uma pipeta de 5ml, os únicos equipamentos necessários à sua realização são um homogeneizador de sangue e uma centrífuga simples, aparelhos presentes na maioria dos laboratórios e de fácil transporte.

Quanto ao custo de execução relativo das três técnicas, o processamento de uma amostra fecal pelos protocolos de Graham et al. (2001) e Schwarzenberger et al. (1991) custava em dezembro de 2005 aproximadamente sete centavos de real (R\$ 0,07) enquanto pelo primeiro protocolo (BROWN et al., 1994), o preço da extração era avaliado em 18 centavos de real (R\$ 0,18). Trata-se de uma simples avaliação cujo valor é puramente indicativo já que estes custos podem variar consideravelmente em função da proveniência dos reagentes envolvidos.

8 CONCLUSÕES

8 CONCLUSÕES

A análise dos nossos resultados sugere as seguintes conclusões:

8.1 O método empregado para avaliação da capacidade de recuperação de três protocolos de extração de metabólitos fecais de hormônios esteróides pode ter subestimado a eficiência do protocolo 1 (BROWN et al., 1994). O protocolo 2 (GRAHAM et al., 2001) alcançou maiores índices de recuperação da progesterona e da testosterona triciada. O protocolo 3 (SCHWARZENBERGER et al., 1991) mostrou-se mais eficiente do ponto de vista numérico na recuperação do cortisol triciado.

8.2 Com menos etapas e de realização mais simples do que os outros métodos, o protocolo 2 (GRAHAM et al., 2001) ainda apresenta sobre aquele descrito por Brown et al. (1994) a vantagem de ser mais econômico. Ao contrário da metodologia desenvolvida por Schwarzenberger et al. (1991), ele só faz uso de álcool etílico, relativamente pouco tóxico e de fácil descarte.

8.3 A capacidade de recuperação de um protocolo de extração de esteróides fecais pode ser avaliada medindo a sua capacidade de recuperar uma quantidade conhecida de hormônio marcado radioativamente e incorporado a algumas amostras fecais antes de submetê-las ao processo de extração. Para que as duas medidas sejam comparáveis, porém, a determinação da radioatividade do hormônio acrescentado deve ser medida em extrato obtido da mesma amostra fecal, ao qual o hormônio marcado é adicionado após a

extração. Desta maneira, eventuais efeitos das características do extrato sobre a medida afetam tanto a determinação do valor total adicionado, como aquela do valor extraído.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- BAHR, N. I.; PALME, R.; MÖHLE, U.; HODGES, J. K.; HEISTERMANN, M. Comparative aspects of the metabolism and excretion of cortisol in three individual nonhuman primates. **General and Comparative Endocrinology**, v. 117, n. 3, p. 427-438, 2000.
- BAMBERG, E.; CHOI, H. S.; MÖSTL, E.; WURM, W.; LORIN, D.; ARBEITER, K. Enzymatic determination of unconjugated oestrogens in faeces for pregnancy diagnosis in mares, **Equine Veterinary Journal**, v. 16, n. 6, p. 537-539, 1984.
- BAMBERG, E.; MÖSTL, E.; PATZL, M.; KING, G. J. Pregnancy diagnosis by enzyme immunoassay of estrogens in feces from nondomestic species. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 22, n. 1, p. 73-77, 1991.
- BAMBERG, E.; PALME, R.; MEINGASSNER, J. G. Excretion of corticosteroid metabolites in urine and faeces of rats. **Laboratory Animals**, v. 35, n. 4, p. 307-314, 2001.
- BARDI, M.; SHIMIZU, K.; BARRETT, G. M.; BORGOGNINI-TARLI, S. M.; HUFFMAN, M. A. Peripartum sex steroid changes and maternal style in rhesus and Japanese macaques. **General and Comparative Endocrinology**, v. 133, n. 3, p. 323-331, 2003.
- BARRETT, G. M.; SHIMIZU, K.; BARDI, M.; ASABA, S.; MORI, A. Endocrine correlates of rank, reproduction, and female-directed aggression in male Japanese macaques (*Macaca fuscata*). **Hormones and Behavior**, v. 42, n. 1, p. 85-96, 2002.
- BERBARE, P. E. B., **Avaliação longitudinal das concentrações de esteróides fecais em fêmeas de gato-mourisco (*Herpailurus yagouarundi*, Lacépède, 1809)**. 2004. 111 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- BILLITTI, J. E.; LASLEY, B. L.; WILSON, B. W. Development and validation of a fecal testosterone biomarker in *Mus musculus* and *Peromyscus maniculatus*. **Biology of Reproduction**, v. 59, n. 5, p. 1023-1028, 1998.
- 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, n. 4, p. 776-786, 1994.
- CAMPBELL, C. J.; SHIDELER, S. E.; TODD, H. E.; LASLEY, B. L. Fecal analysis of ovarian cycles in female black-handed spider monkeys (*Ateles geoffroyi*). **American Journal of Primatology**, v. 54, n. 2, p. 79-89, 2001.

CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE, **Guidelines on the care and use of wildlife**. Ottawa, 2003. 69p. Disponível em: <<http://www.ccac.c>.> Acesso em: 7 out. 2004.

CAPEZZUTO, A. **Excreção fecal de progesterona e 17 β -estradiol: estudo endocrinológico longitudinal durante a gestação em cabras (*Capra hircus*, Linnaeus, 1758)**. 2005. 116 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

CHASIN, A. A. M.; CHASIN, M.; SALVADORI, M. C. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. **Revista de Farmácia e Bioquímica**, v. 30, n. 2, p. 49-53, 1994.

CHELINI, M. O. M.; SOUZA, N. L.; ROCHA, A. M.; FELIPPE, E. C. G.; OLIVEIRA, C. A. Quantification of fecal estradiol and progesterone metabolites in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 11, p. 1711-1717, 2005.

CHOI, H. S.; KIESENHOFER, E.; GANTNER, H.; HOIS, J.; BAMBERG, E. Pregnancy diagnosis in sows by estimation of oestrogens in blood, urine and faeces. **Animal Reproduction Science**, v. 15, n.3-4, p. 209-216, 1987.

CRICHTON, E. G.; BEDOWS, E.; MILLER-LINDHOLM, A. K.; BALDWIN, D. M.; ARMSTRONG, D. L.; GRAHAM, L. H.; FORD, J. J.; GJORRET, J. O.; HYTTEL, P.; POPE, C. E.; VAJTA, G.; LOSKUTOFF, N. M. Efficacy of porcine gonadotropins for repeated stimulation of ovarian activity for oocyte retrieval and *in vitro* embryo production and cryopreservation in Siberian tigers (*Panthera tigris altaica*). **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 1, p. 105-113, 2003.

DE LUCA, R. R.; ALEXANDRE, S. R.; MARQUES, T.; SOUZA, N. L.; MERUSSE, J. L. B.; NEVES, S. P. **Manual para técnicos em bioterismo**. 2. ed. São Paulo: Winnergraph, 1996. 259 p.

DESAULNIERS, V. L.; GOFF, A. K.; BETTERRIDGE, K. J.; ROWELL, J. E.; FLOOD, P. F. Reproductive hormone concentrations in faeces during the oestrous cycle and pregnancy in cattle (*Bos Taurus*) and muskoxen (*Ovibus moschatus*). **Canadian Journal of Zoology**, v. 67, n. 5, p. 1148-1154, 1989.

FIESS, M.; HEISTERMANN, M.; HODGES, J. K. Patterns of urinary and fecal steroid excretion during the ovarian cycle and pregnancy in the African elephant (*Loxodonta africana*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 115, n. 1, p. 76-89, 1999.

FOLEY, C. A., PAPAGEORGE, S., WASSER, S. K. Noninvasive stress and reproductive measures of social and ecological pressures in free-ranging African elephants. **Conservation Biology**, v. 15, n. 4, p. 1134-1142, 2001.

FUJITA, S.; MITSUNAGA, F.; SUGIURA, H.; SHIMIZU, K. Measurement of urinary and fecal steroid metabolites during the ovarian cycle in captive and wild Japanese macaques, *Macaca fuscata*. **American Journal of Primatology**, v. 53, n. 4, p. 167-176, 2001.

GOOD, T.; KHAN, M. Z.; LYNCH, J. W. Biochemical and physiological validation of a corticosteroid radioimmunoassay for plasma e fecal samples in oldfield mice (*Peromyscus polionotus*). **Physiology and Behavior**, v. 80, n. 2-3, p. 405-411, 2003.

GOYMANN, W.; MOSTL, E.; GWINNER, E. Non-invasive methods to measure androgen metabolites in excrements of European stonechats, *Saxicola torquata rubicola*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 129, n. 2, p. 80-87, 2002.

GRAHAM, L. H.; GOODROWE, K. L.; RAESIDE, J. I.; LIPTRAP, R. M. Non-invasive monitoring of ovarian function in several felid species by measurement of fecal estradiol-17 β and progestins. **Zoo Biology**, v. 14, n. 3, p. 223-237, 1995.

GRAHAM, L.; SCHWARZENBERGER, F.; MÖSTL, E.; GALAMA, W.; SAVAGE, A. A versatile enzyme immunoassay for the determination of progestogens in feces and serum. **Zoo Biology**, v. 20, n. 3, p. 227-236, 2001.

GUDERMUTH, D. F.; CONCANNON, P. W.; DAELS, P. F.; LASLEY, B. L. Pregnancy-specific elevations in fecal concentrations of estradiol, testosterone and progesterone in the domestic dog (*Canis familiaris*). **Theriogenology**, v. 50, n. 2, p. 237-248, 1998.

HARPER, J. M.; AUSTAD, S. N. Effect of capture and season on fecal glucocorticoid levels in deer mice (*Peromyscus maniculatus*) and red-backed voles (*Clethrionomys gapperi*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 123, n. 3, p. 337-344, 2001.

HAYSEN, V.; HARPER, J.M.; DEFINA, R., Fecal corticosteroids in agouti and non-agouti deer mice (*Peromyscus maniculatus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 132, n. 2, p. 439-446, 2002.

HEISTERMANN, M.; MÖHLE, U.; VERVAECKE, H.; van HELSACKER, L.; HODGES, J. K. Application of urinary and fecal steroid measurements for monitoring ovarian function and pregnancy in the bonobo (*Pan paniscus*) and evaluation of perineal swelling patterns in relation to endocrine events. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 4, p. 844-853, 1996.

HEISTERMANN, M.; TARI, S.; HODGES, J. K. Measurement of faecal steroids for monitoring ovarian function in New World primates, Callitrichidae. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.99, n. 1, p. 243-251, 1993.

HUNT, K. E.; TRITES, A. W.; WASSER, S. K. Validation of a fecal glucocorticoid assay for Steller sea lions (*Eumetopias jubatus*). **Physiology and Behavior**, v. 80, n. 5, p. 595-601, 2004.

ISOBE, N.; NAKAO, T. Pregnancy diagnosis in miniature pig by direct ELISA of oestrone derivatives in faeces. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 39, n. 1, p. 48-51, 2004.

ISOBE, N.; NAKAO, T.; YAMASHIRO, H.; SHIMADA, M. Enzyme immunoassay of progesterone in the feces from beef cattle to monitor ovarian cycle. **Animal Reproduction Science**, v. 87, n. 1-2, p. 1-10, 2005.

KIRKPATRICK, J. F.; SHIDELER, S. E.; LASLEY, B. L.; TURNER Jr., J. W. Pregnancy determination in uncaptured feral horses by means of fecal steroid conjugates. **Theriogenology**, v. 35, n. 4, p. 753-760, 1991.

KISHI, H.; TAYA, K.; WATANABE, G.; SASAMOTO, S. Follicular dynamics and secretion of inhibin and oestradiol-17 β during the oestrous cycle of the hamster. **Journal of Endocrinology**, v. 146, n. 1, p. 169-176, 1995.

LASLEY, B. L.; KIRKPATRICK, J. F. Monitoring ovarian function in captive and free-ranging wildlife by means of urinary and fecal steroids. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 212, n. 1, p. 23-31, 1991.

LYNCH, J. W.; KHAN, M. Z.; ALTMANN, J.; NJAHIRA, M. N.; RUBENSTEIN, N. Concentration of four fecal steroids in wild baboons: short-term storage conditions and consequences for data interpretation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 132, n. 2, p. 264-271, 2003.

LYNCH, J. W.; ZIEGLER, T. E.; STRIER, K. B. Individual and seasonal variation in fecal testosterone and cortisol levels of wild male tufted capuchin monkeys, *Cebus apella nigrilus*. **Hormones and Behavior**, v. 41, n. 3, p. 275-287, 2002.

MATSUMORO, M.; SANKAI, T.; CHO, F.; YOSHIKAWA, Y.; YOSHIDA, T. A two-step extraction method to measure fecal steroid hormones in female cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). **American Journal of Primatology**, v. 48, n. 4, p. 291-298, 1999.

MILLSPAUGH, J. J.; WASHBURN, B. E. Within-sample variation of fecal glucocorticoid measurements. **General and Comparative Endocrinology**, v. 132, n. 1, p. 21-26, 2003.

MIYAMOTO, S.; CHEN, Y.; KUROTORI, H.; SANKAI, T.; YOSHIDA, T.; MACHIDA, T. Monitoring the reproductive status of female gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*) by measuring the steroid hormones in fecal samples. **Primates**, v. 42, n. 4, p. 291-299, 2001.

MÖHLE, U.; HEISTERMANN, M.; PALME, R.; HODGES, J. K. Characterization of urinary and fecal metabolites of testosterone and their measurement for

assessing gonadal endocrine function in male nonhuman primates. **General and Comparative Endocrinology**, v. 129, n. 3, p. 135-145, 2002.

MORAIS, R. N.; MUCCIOLO, R. G.; GOMES, M. L. F.; LACERDA, O.; MORAES, W.; MOREIRA, N.; GRAHAM, L. H.; SWANSON, W. F.; BROWN, J. L. Seasonal analysis of semen characteristics, serum testosterone, and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. wiedii*) and tigrina (*L. tigrinus*). **Theriogenology**, v. 57, n. 8, p. 2027-2041, 2002.

MORATO, R. G.; BUENO, M. G.; MALMHEISTER, P.; VERRESCHI, I. T. N.; BARNABE, R. C. Changes in the fecal concentrations of cortisol and androgen metabolites in captive male jaguars (*Panthera onca*) in response to stress. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 12, p. 1903-1907, 2004a.

MORATO, R. G.; VERRESCHI, I. T. N.; GUIMARÃES, M. A. B. V.; CASSARO, K.; PESSUTI, C.; BARNABE, R. C. Seasonal variations in the endocrine-testicular function of captive jaguars (*Panthera onca*). **Theriogenology**, v. 61, n. 7-8, p. 1273-1281, 2004b.

MOREIRA, N.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A.; MORAES, W.; SWANSON, W. F.; GRAHAM, L. H.; PASQUALI, O. L.; GOMES, M. L. F.; WILDT, D. E.; BROWN, J. L. Reproductive steroid hormones and ovarian activity in felids of the *Leopardus* genus. **Zoo Biology**, v. 20, n. 2, p. 103-116, 2001.

MORELAND, R. B.; RICHARDSON, M. E.; LAMBERSKI, N.; LONG, J. A. Characterizing the reproductive physiology of the male southern black howler monkey, *Alouatta caraya*. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 3, p. 395-403, 2001.

MORIYOSHI, M.; NOZOKI, K.; OHTAKI, T.; NAKADA, K.; NAKAO, T.; KAWATA, K. Measurement of gestagen concentration in feces using a bovine milk progesterone quantitative test EIA kit and its application to early pregnancy diagnosis in the sow. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 59, n. 8, p. 695-701, 1997.

MÖSTL, E.; CHOI, H. S.; WURM, W.; ISMAIL, N.; BAMBERG, E. Pregnancy diagnosis in cows and heifers by determination of oestradiol-17 α in faeces. **British Veterinary Journal**, v. 140, n. 3, p. 287-291, 1984.

MUIR, C.; SPIRONELLO-VELLA, E.; PISANI, N.; de CATANZARO, D. Enzyme immunoassay of 17 β -estradiol, estrone conjugates, and testosterone in urinary and fecal samples from male and female mice. **Hormone and Metabolism Research**, v. 33, n. 11, p. 653-658, 2001.

OATES, J. E.; BRADSHAW, F. J.; BRADSHAW, S. D.; LONSDALE, R. A. Sex identification and evidence of gonadal activity in the shorted-beaked echidna (*Tachyglossus aculeatus*) (Monotremata: Tachyglossidae): non-invasive analysis of fecal sex steroids. **Australian Journal of Zoology**, v. 50, n. 4, p. 395-406, 2002.

OSTNER, J.; HEISTERMANN, M. Endocrine characterization of female reproductive status in wild redfronted lemurs (*Eulemur fulvus rufus*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 131, n. 3, p. 274-283, 2003.

PALME, R.; FISCHER, P.; SCHILDORFER, H.; ISMAIL, M. N. Excretion of infused ^{14}C -steroid hormones via faeces and urine in domestic livestock. **Animal Reproduction Science**, v. 43, n. 1, p. 43-63, 1996.

PALME, R.; MÖSTL, E.; BREM, G.; SCHELLANDER, K.; BAMBERG, E. Faecal metabolites of infused C-Progesterone in domestic livestock. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 32, n. 4, p. 199-206, 1997.

PARIS, M. C. J.; WHITE, A.; REISS, A. WEST, M.; SCHWARZENBERGER, F. Faecal progesterone metabolites and behavioral observations for the non-invasive assessment of oestrous cycles in the common-wombat (*Vombatus ursinus*) and the southern hairy-nosed wombat (*Lasiorninus latifrons*). **Animal Reproduction Science**, v. 72, n. 3-4, p. 245-257, 2002.

PELLETIER, F.; BAUMAN, J.; FESTA-BIANCHET, M. Fecal testosterone in bighorn sheep (*Ovis Canadensis*): behavioural and endocrine correlates. **Canadian Journal of Zoology**, v. 81, n. 10, p. 1678-1684, 2003.

PEREIRA, R. J. G.; DUARTE, J. M. B.; NEGRÃO, J. A. Seasonal changes in fecal testosterone concentrations and their relationship to the reproductive behavior, antler cycle and grouping patterns in free-ranging male Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus bezoarticus*). **Theriogenology**, v. 63, n. 8, p. 2113-2125, 2005.

PICKARD, A. R.; HOLT, W. V.; GREEN, D. I.; CANO, M.; ABÁIGAR, T. Endocrine correlates of sexual behavior in the Mohor gazelle (*Gazella dama mhor*). **Hormones and Behavior**, v. 44, n. 4, p. 303-310, 2003.

PIHL, L.; HAU, J. Faecal corticosterone and immunoglobulin A in young adult rats. **Laboratory Animals**, v. 37, n. 2, p. 166-171, 2003.

RABIEE, A. R.; MACMILLAN, K. L.; SCHWARZENBERGER, F. The effect of level of feed intake on progesterone clearance rate by measuring faecal progesterone metabolites in grazing dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 67, n. 3-4, p. 205-214, 2001.

RIBEIRO NETO, L. M. **Avaliação dos níveis urinários de hydrocortisone em cavalos de corrida visando o controle antidopagem**. 1999. 81f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

RUSSEL, W. M. S.; BURCH, R. L. The principles of humane experimental technique. Universities Federation for Animal Welfare, London, 1992.
Disponível em: <http://altweb.jhsph.edu.science/pubs/humane_exp/>. Acesso em: 13 maio 2004.

SCHWARZENBERGER, F.; FRANCKE, R.; GÖLTENBOTH, R. Concentrations of faecal immunoreactive progestagen metabolites during the oestrous cycle and pregnancy in the black rhinoceros (*Diceros bicornis michaeli*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, n. 1, p. 283-291, 1993.

SCHWARZENBERGER, F.; MÖSTL, E.; BAMBERG, E.; PAMMER, J.; SCHMEHLIK, O. Concentrations of progestagens and oestrogens in the faeces of pregnant Lipizzan, Trotter and Thoroughbred mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, Supplement 44, p. 489-499, 1991.

SCHWARZENBERGER, F.; MÖSTL, E.; BAMBERG, E.; VON HEGEL, G. Monitoring of corpus luteum function by measuring progestagens in faeces of non-pregnant mare (*Equus caballus*) and Przewalski mares (*Equus przewalskii*). **Animal Reproduction Science**, v. 29, n. 3-4, p. 263-273, 1992.

SCHWARZENBERGER, F.; MÖSTL, E.; PALME, R.; BAMBERG, E.; Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals. **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 1-4, p. 515-526, 1996.

SHIDELER, S. E.; ORTUÑO, A. M.; MORÁN, F. M.; MOORMAN, E. A.; LASLEY, B. L. Simple extraction and enzyme immunoassays for estrogen and progesterone metabolites in the feces of *Macaca fascicularis* during non-conceptive and conceptive ovarian cycles. **Biology of Reproduction**, v. 48, n. 6, p. 1290-1298, 1993.

STAVISKY, R. C.; WHITTEN, P. L.; HAMMETT, D. H.; KAPLAN, J. R. Lake pigments facilitate analysis of fecal cortisol and behavior in group-housed macaques. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 116, n. 1, p. 51-58, 2001.

STEINER, R. **Advanced technology guide for LS 6500 series scintillation counters**. Fullerton: Beckman Instruments, 1996. 140 p.

STRIER, K. B.; ZIEGLER, T. E. Behavioral and endocrine characteristics of the reproductive cycle in wild Muriqui monkeys, *Brachyteles arachnoides*. **American Journal of Primatology**, v. 42, n. 4, p. 299-310, 1997.

STRIER, K. B.; ZIEGLER, T. E.; WITTEWER, D. J. Seasonal and social correlates of fecal testosterone and cortisol levels in wild male muriquis (*Brachyteles arachnoides*). **Hormones and Behavior**, v. 35, n. 2, p. 125-134, 1999.

TAKAHASHI, T.; HAMANAKA, S.; IMAI, K.; HASHIZUME, K. Fecal progesterone analysis by time-resolved fluoroimmunoassay (TR-FIA) for monitoring of luteal function in the Sika doe (*Cervus Nippon centralis*). **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 64, n. 7, p. 565-569, 2002.

TALAMANTES, F.; MARR, G.; DI PINTO, M. N.; STETSON, M. H. Prolactin profiles during estrous cycle and pregnancy in hamster as measured by homologous RIA. **American Journal of Physiology: Endocrinology and**

Metabolism, v. 247, p. 126-129, 1984.

THOMPSON, K. V., MASHBURN, K. L., MONFORT, S. L. Characterization of estrous cyclicity in the sable antelope (*Hippotragus niger*) through fecal progesterone monitoring. **General and Comparative Endocrinology**, v. 112, n. 1, p. 129-137, 1998.

THOMPSON, K. V., MONFORT, S. L. Synchronization of oestrous cycles in sable antelope. **Animal Reproduction Science**, v. 57, n. 3-4, p. 185-197, 1999.

TOUMA, C.; PALME, R.; SACHSER, N. Analyzing corticosterone metabolites in fecal samples of mice: a noninvasive technique to monitor stress hormones. **Hormones and Behavior**, v. 45, n. 1, p. 10-22, 2004.

TOUMA, C.; SACHSER, N.; MOSTL, E.; PALME, R. Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice, **General and Comparative Endocrinology**, v. 130, n. 3, p. 267-278, 2003.

VASCONCELLOS, A. S. **Enriquecimento ambiental para o lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*)**. 2004. 108 p. Dissertação (Mestrado em Psicologia) – Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

VIAU, P. F. **Estudo da avaliação ovariana em fêmeas de onça pintada (*Panthera onca*, Linnaeus, 1758) mantidas em cativeiro por meio da extração e quantificação de esteróides fecais**. 2003. 83 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

WASHBURN, B. E.; MILSPAUGH, J. J. Effects of simulated environmental conditions on glucocorticoid metabolite measurements in white-tailed deer feces. **General and Comparative Endocrinology**, v. 127, n. 3, p. 217-222, 2002.

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. **General and Comparative Endocrinology**, v. 120, n. 3, p. 260-275, 2000.

WASSER, S. K., MONFORT, S. L.; WILDT, D. E. Rapid extraction of fecal steroids for measuring reproductive cyclicity and early pregnancy in free-ranging yellow baboons (*Papio cynocephalus cynocephalus*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 92, n. 2, p. 415-423, 1991.

WEINGRILL, T.; GRAY, D. A.; BARRETT, L.; HENZI, S. P. Fecal cortisol levels in free-ranging female chacma baboons: relationship to dominance, reproductive state and environmental factors. **Hormones and Behavior**, v. 45, n. 4, p. 259-269, 2004.

YOUNG, K. M.; WALKER, S. L.; LANTHIER, C.; WADDWILL, W. T.; MONFORT, S. L.; BROWN, J. L. Noninvasive monitoring of adrenocortical activity in carnivores by fecal glucocorticoid analyses. **General and Comparative Endocrinology**, v. 137, n. 2, p.148-165, 2004.

ZIEGLER, T. E.; SANTOS, C. V.; PISSINATTI, A.; STRIER, K. B. Steroid excretion during the ovarian cycle in captive and wild muriquis, *Brachyteles arachnoides*. **American Journal of Primatology**, v. 42, n. 4, p. 311-321, 1997.

ZIEGLER, T. E.; SCHEFFLER, G.; WITTWER, D. J.; SCHULTZ-DARKEN, N.; SNOWDON, C. T.; ABBOTT, D. H. Metabolism of reproductive steroids during the ovarian cycle in two species of Callitrichids, *Saguinus oedipus* and *Callithrix jacchus*, and estimation of the ovulatory period from fecal steroids. **Biology of Reproduction**, v. 54, n. 1, p. 91-99, 1996.

ZIEGLER, T. E., WITTWER, D. J. Fecal steroid research in the field and laboratory: improved methods for storage, transport, processing, and analysis. **American Journal of Primatology**, v. 67, n. 1, p. 159-174, 2005.