PRISCILA VIAU FURTADO

**PERFIL ANALÍTICO DE ESTRÓGENOS E PROGESTINAS
EM DIFERENTES MATRIZES BIOLÓGICAS NA ESPÉCIE
OVINA (*Ovis aires*)**

SÃO PAULO

2007

PRISCILA VIAU FURTADO

**Perfil analítico de estrógenos e progestinas em diferentes
matrizes biológicas na espécie ovina (*Ovis aires*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira

São Paulo

2007

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1892
FMVZ

Furtado, Priscila Viau
Perfil analítico de estrógenos e progestinas em diferentes matrizes biológicas na espécie ovina (*Ovis aires*) / Priscila Viau Furtado. -- São Paulo: P. V. Furtado, 2007.
96 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2007.

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

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira.

1. Ovinos. 2. Ciclo estral animal. 3. Endocrinologia. 4. Esteróides.
5. Imunoensaio. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão de Bioética

PARECER

Interessado: Priscilla Viau Furtado

Assunto: Protocolo de Experimentação adotado em experimento animal.

A Presidência da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e após analisar o projeto protocolado sob o número 1219/2007, intitulado: "Perfil analítico de estrógenos e progestinas em diferentes matrizes biológicas utilizando ovinos como modelo experimental", no qual foram utilizados 08 (oito) ovelhas, sob responsabilidade da Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira, constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de bioética, adotados por esta Comissão.

São Paulo, 04 de outubro de 2007

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: FURTADO, Priscila Viau

Título: Perfil analítico de estrógenos e progestinas em diferentes matrizes biológicas na espécie ovina (*Ovis aires*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Este trabalho é dedicado a uma pessoa muito especial, que teve um papel fundamental na minha formação e que me ensinou acima de tudo a lutar por meus objetivos. Eu fecho os olhos, e me lembro do seu rosto com aquele olhar carinhoso e orgulhoso em relação a mim na minha primeira conquista profissional, o título de “Médica Veterinária”. Se eu soubesse que depois desse dia nós só nos veríamos em duas outras ocasiões, eu teria aproveitado muito mais o seu colo.

*À minha querida mãe,
Neusa Marina Viau (in memoriam).*

A Marina e Luana,

*Minhas queridas filhas, muito obrigado por encher os meus dias com
tanto amor e alegria.*

Ao meu amado marido Marcelo,

*Sem o seu amor, ajuda e compreensão nada
disso teria sido possível.*

Amo vocês!!!!!!!

Ao meu querido pai André,

por todos os ensinamentos que fizeram de mim o que eu sou hoje,

e a querida Tia Luíza por ter cuidado sempre com tanto carinho das minhas filhas

e sem o seu apoio eu não teria finalizado esse trabalho.

Ao meu irmão André,

O que seria de mim sem um irmão como você.

À toda minha família de Recife

Tia Lia, Vozinha e meus primos queridos.

Mesmo distantes eu sei que vocês torcem por mim e vibram com as

minhas conquistas.

A família do meu marido que me acolheu e me ajudam muito, em especial a

Silvia, Roberto e Junior; Ana Maria e Tia Lurdes

Muito Obrigada !

Agradecimentos

Ao meu querido orientador, **Prof Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira**, por ter me acolhido em seu laboratório e me iniciado no campo das dosagens hormonais, seus ensinamentos foram importantes para o meu crescimento profissional e pessoal, muito obrigado por você ter confiado no meu potencial de trabalho e ter me dado asas para voar.

Ao **Prof Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães**, acima de tudo um amigo que sempre esteve disposto a me ajudar e orientar, um exemplo de profissional e uma referência para aqueles que desejam trabalhar com animais silvestres, seu apoio foi fundamental para realização desse trabalho.

Ao **Prof Dr. Juan Carlos Illera Del Portal**, do Departamento de Fisiologia da Universidade Complutense de Madrid por ter me aceitado como estagiária e ter disponibilizado todo o seu laboratório e equipe no meu treinamento em enzimaímunoensaio.

À **Profa Dra Gema Silvan**, do Departamento de Fisiologia da Universidade Complutense de Madrid pelo treinamento técnico e pelo apoio recebido durante a minha estadia em Madrid.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES) pela bolsa de doutorado.

A **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP) pelo auxílio (nº2006/04657-0) concedido para implementação da técnica de enzimaímunoensaio no laboratório de dosagens hormonais (LDH).

À Magnífica **Reitora Profa. Dra. Suely Vilela**, por ter concedido o auxílio financeiro do gabinete da reitoria para o treinamento técnico no Departamento de Fisiologia da Universidade Complutense de Madrid.

A **Comissão de Cooperação Internacional** (CCInt-USP) pela auxílio financeiro concedido para custear parte dos gastos com o treinamento técnico realizado no Departamento de Fisiologia da Universidade Complutense de Madrid.

À **Profa Dra Lilian Gregory**, do Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP, por ter disponibilizado a sua equipe na etapa inicial desse trabalho.

À **Profa Dra Áurea Wischral**, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, por ter sido considerada como sua pupila que as portas do VRA se abriram para mim.

À técnica do laboratório de Bioquímica do Deptº de Clínica Médica FMVZ-USP, **Marly Elisabeth Faccio Ferreira**, pela competência durante as dosagens de creatinina e a **Profa Maria Helena M. A. Larsson**, por ter permitido que essas dosagens fossem executadas no seu laboratório.

À minha querida amiga **Débora C. R. Guisso**, sem o seu apoio não teríamos conseguido introduzir a técnica de enzima no LDH, teremos muito trabalho pela frente. Você será sempre uma grande amiga.

Ao meu amigo **Rodrigo Amaral**, pela colaboração no processo de extração das matrizes urinárias e por toda ajuda recebida durante a execução desse experimento.

As queridas amigas **Manuela G. F. G. Sgai** e **Cristiane S. Pizzutto**, dois “anjinhos” que chegaram aos 48 minutos do segundo tempo, e me ajudaram a enquadrar esse trabalho nos moldes exigidos pelas normas acadêmicas.

À estagiária **Ângela Reghelin**, da Universidade do Paraná sem o seu apoio na Rotina do Laboratório de Dosagens Hormonais nesses dois meses eu não teria conseguido finalizar esse trabalho.

As alunas de iniciação científica **Érica Van Tol** e **Monique Pereira**, pela colaboração prestada na organização das matrizes biológicas.

Ao amigo **Marcílio Nichi**, que bom que pude contar com sua ajuda na análise estatística.

Aos amigos **Cláudia Calamari**, **Marie-Odile Chelini**, **Lilian Rangel de Castilhos**, **Flaviana Guião-Leite** e **Alexandre Bastos** por todos os bons momentos em que passamos no LDH.

As secretárias e amigas de trabalho **Harumi**, **Thaís** e **Alice**, pela ajuda em amenizar toda a burocracia que nos cercam no dia-a-dia, sempre de forma eficiente.

Aos funcionários e colegas de trabalhos **Miguel**, **D.Silvia** e **Jocimar**, por sempre ter atendido de forma prestativa as minhas solicitações.

Aos **Professores do Departamento de Reprodução Animal**, responsáveis pela minha formação intelectual durante o curso de pós-graduação.

A **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP**, minha segunda casa a qual eu me orgulho de fazer parte.

A todos que de uma forma ou de outra, estiveram presentes durante a execução deste trabalho, de todo coração

MUITO OBRIGADA !

RESUMO

FURTADO, P. V. **Perfil analítico de estrógenos e progestinas em diferentes matrizes biológicas na espécie ovina (*Ovis aries*)**. [Analytic profile of estrogens and progestins in different biological matrixes in the ovine (*Ovis aries*)]. 2007. 96 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

O objetivo deste trabalho foi avaliar de maneira detalhada e sistemática os perfis hormonais sanguíneos, fecais, urinários e salivares das progestinas e estrógenos durante o ciclo estral induzido de ovinos. Foram colhidas amostras diárias durante um período de 60 dias de sete fêmeas adultas ($n=8$) saudáveis e sexualmente maduras. Antes do início da fase de colheita das amostras, todos os animais foram submetidos ao protocolo de tratamento hormonal para indução e sincronização do cio durante dozes dias. O primeiro ciclo ovariano de cada animal desse experimento, detectado logo após a indução do cio foi descartado e seus valores não foram utilizados nas análises hormonais, pois poderiam estar sob o efeito dos hormônios exógenos. A concentração dos progestágenos foi determinada pelas técnicas analíticas de Radioimunoensaio (RIE) e Enzimaimunoensaio (EIE) e os estrógenos por RIE. Houve correlações entre as concentrações de progesterona medidas nas matrizes sérica e fecal, sérica e salivar, fecal e salivar ($r=0,90$, $p<0,0001$; $r=0,90$, $p<0,0001$; $r=0,92$, $p<0,0001$, respectivamente) durante os ciclos estrais observados ($n=15$). Obtivemos correlação ($r=0,74$, $p<0,0001$) entre as concentrações dos estrógenos quantificados nas matrizes sérica e fecal, mas não entre estas concentrações e aquelas medidas na matriz salivar. Não obtivemos nenhuma correlação entre as concentrações medidas na matriz urinária com as quantificadas nas outras matrizes para nenhum dos hormônios estudados. Obtivemos correlação entre as concentrações de progesterona medidas na matriz fecal pelos métodos de RIE e EIE ($r=0,78$, $p<0,0001$) e também na matriz salivar pelos dois métodos empregados ($r=0,81$, $p<0,0001$). Os resultados do presente experimento indicam que os imunoensaios utilizados podem ser utilizados para a avaliação das

concentrações de progestágenos nas matrizes fecal e salivar durante o ciclo estral em ovinos.

Palavras-chave: Ovinos. Ciclo estral animal. Endocrinologia. Esteróides. Imunoensaio.

ABSTRACT

FURTADO, P. V. **Analytic profile of estrogens and progestins in different biological matrixes in the ovine (*Ovis aires*)**. [Perfil analítico de estrógenos e progestinas em diferentes matrizes biológicas na espécie ovina (*Ovis aires*)]. 2007. 96 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

The aim of the present work was evaluate the hormonal profiles of progestins and estrogens in blood, feces, urine and saliva during the induced estral cycle in ovine. Samples were collected daily a 60-day period from eight adult (n=8) cycling ewes. The animals were previously submitted to a protocol of estrus induction and synchronization for twelve days. In order to avoid the effect of exogenous hormones, the first cycle immediately after the synchronization was not considered for hormonal analysis. Progestagen concentrations were quantified by two analytical techniques, radioimmunoassay (RIA) and enzyme immunoassay (EIA). Estrogen concentrations were assessed by radioimmunoassay. Correlations in progesterone concentrations were found to be significant for serum and feces, serum and saliva and feces and saliva ($r=0.90$, $p<0.0001$; $r=0.90$, $p<0.0001$; $r=0.92$, $p<0.0001$, respectively) during the estrous cycles (n=15). Estrogen concentrations in the serum and feces were also positively correlated ($r=0.74$, $p<0.0001$). Salivary concentrations of estrogens were not correlated with fecal or serum concentrations of the same hormone. No correlation was found between urinary concentrations and concentrations found in other matrixes for both progestagens and estrogens. Concentrations of progestagens obtained using RIA and EIA were correlated on feces ($r=0.78$, $p<0.0001$) and saliva ($r=0.81$, $p<0.0001$). Results indicate that both immunoassays used in the present experiment can be used to evaluate progestagen concentrations on fecal and salivary matrixes during the estrous cycle of sheep.

Key words: Ovine. Animals estrous cycle. Endocrinology. Steroids. Immunoassay.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	CICLO ESTRAL EM OVINOS.....	20
2.2	HORMÔNIOS ESTERÓIDES.....	21
2.3	METABOLIZAÇÃO DOS HORMÔNIOS ESTERÓIDES.....	22
2.4	MONITORAMENTO NÃO INVASIVO NO ESTUDO DA FUNÇÃO ENDÓCRINA.....	25
2.5	METODOLOGIAS ANALÍTICAS.....	27
2.5.1	RADIOIMUNOENSAIO.....	27
2.5.2	ENZIMAIMUNOENSAIO.....	28
2.6	PEQUENOS RUMINANTES COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA CERVÍDEOS.....	30
3	OBJETIVOS.....	33
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1	ANIMAIS E INSTALAÇÕES EXPERIMENTAIS.....	35
4.2	INDUÇÃO E SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO.....	35
4.3	COLHEITA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS.....	36
4.4	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	37
4.4.1	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS FECAIS.....	37
4.4.2	EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS FECAIS.....	38
4.4.3	TRANSFORMAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DETERMINADAS POR RIE.....	38
4.4.4	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS URINÁRIAS.....	39
4.4.5	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS SALIVARES.....	40
4.5	DOSAGENS HORMONAIS.....	41

4.5.1	ANÁLISES HORMONAIS POR RADIOIMUNOENSAIO (RIE).....	41
4.5.1.1	ENSAIOS DE ESTRADIOL E PROGESTERONA PARA MATRIZ SALIVAR.....	43
4.6	CONTROLE DE QUALIDADE.....	45
4.7	VALIDAÇÃO LABORATORIAL.....	45
4.7.1	VALIDAÇÃO FISIOLÓGICA.....	45
4.8	ALINHAMENTO DOS CICLOS OVARIANOS.....	46
4.9	ANÁLISES HORMONAIS POR ENZIMAIMUNOENSAIO (EIE).....	46
4.9.1	TESTE DE TITULAÇÃO.....	47
4.9.2	DESENVOLVIMENTO DA TÉCNICA.....	48
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1	PARÂMETROS DE QUALIDADE DOS ENSAIOS HORMONAIS (RIE).	53
5.2	VALIDAÇÃO DOS CONJUNTOS DIAGNÓSTICOS COMERCIAIS – RIE.....	57
5.3	VALIDAÇÃO FISIOLÓGICA.....	61
5.4	ENZIMAIMUNOENSAIO.	64
5.5	HIDRÓLISE X SOLVÓLISE.....	68
5.6	PERFIL HORMONAL.....	68
6	CONCLUSÃO	80
	REFERENCIAS	82

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Entender como os animais se reproduzem é fundamental no manejo e conservação da vida selvagem. Historicamente, tais informações para animais domésticos recaiam na observação sistemática dos comportamentos social e reprodutivo. Com a habilidade de desenvolvimento de anticorpos específicos contra hormônios esteróides e protéicos surge o radioimunoensaio. A possibilidade de coletas seriais de sangue dos animais domesticados permitiu o estabelecimento dos padrões de secreção destes hormônios ao longo do tempo. Informações substanciais sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas em machos e fêmeas permitiu o delineamento: (1) da função gonadal baseada no sexo, idade e sazonalidade; (2) do *timing* da espermatogênese e ovulação; (3) do tipo de ovulação (espontânea ou induzida); (4) de metodologias para superar a infertilidade; e (5) de protocolos para reprodução assistida consistentes por meio de inseminação artificial ou transferência de embriões. Estes marcos nos animais domésticos foram possíveis, pois os hormônios puderam ser medidos em amostras de sangue facilmente coletadas, em consequência proveram as pistas sobre como a reprodução animal funciona (PUKAZHENTI; WILTD, 2004).

Em contraste, é impossível e perigoso conseguir amostras sequenciais de sangue na maioria das espécies silvestres. Nos anos 70, iniciou-se o desenvolvimento das técnicas anestésicas em animais selvagens que permitiram a amostragem esporádica de sangue que gerou dados suficientes que sugeriram que os padrões hormonais nos animais selvagens eram diferentes das espécies domésticas. Contudo, o problema recaía no fato de que poucas amostras de sangue foram colhidas para plotar um perfil hormonal longitudinal. Além disso, há evidências de que o estresse da anestesia pode alterar o padrão normal de secreção hormonal no sangue do doador. Era necessário o desenvolvimento de uma ferramenta alternativa para essas análises (PUKAZHENTI; WILTD, 2004).

Por mais de 26 anos, laboratórios independentes desenvolveram técnicas pioneiras para avaliação de padrões hormonais em fezes e urina (HODGES et al., 1979; BAMBERG et al., 1984; MONFORT et al., 1990; LASLEY; KIRKPATRICK 1991; GARNIERA et al., 1998; SCHWARZENBERGER et al., 1998) ou mesmo em saliva (CZEKALA; CALLISON, 1996). Metabólitos hormonais excretados nas fezes e

urina refletem acuradamente os padrões hormonais no sangue, com, é claro, a demora apropriada na passagem do sangue para a excreta (PALME et al., 1996).

O monitoramento dos metabólitos de esteróides sexuais excretados nas fezes permitiu a caracterização efetiva do ciclo estral, prenhez e padrões sazonais da reprodução de várias espécies de ungulados, equídeos e bovídeos (HINDLE, 1990; BAMBERG et al., 1991; LASLEY; KIRKPATRICK, 1991; HOPPEN et al., 1992; KIRKPATRICK et al., 1992; SCHWARZENBERGER et al., 1992; SCHWARZENBERGER et al., 1993; SCHEIBE, 1999; MORROW et al., 2000; ASA et al., 2001; PICKARD et al., 2001; KALLERT et al., 2002; SCHOENECKER et al., 2004; OSTROWSKI et al., 2005; VERVAECKE; SCHWARZENBERGER, 2006; PEREIRA et al., 2006; MAUGET et al., 2007).

Devido a uma origem evolutiva comum, há muitos paralelos existentes entre a fisiologia reprodutiva dos cervídeos com a dos bovídeos, principalmente com a fisiologia dos pequenos ruminantes (FLINT, 1996). Tais fatos sugerem a possibilidade do uso de ovinos como modelo experimental para estudo de cervídeos, bovídeos e ungulados silvestres atendendo à necessidade do desenvolvimento de mais pesquisas em reprodução comparada (JABBOUR; BAINBRIDGE, 1996).

Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo, estudar de uma maneira detalhada e sistemática os perfis hormonais sanguíneos, fecais, urinários e salivares das progestinas e dos estrógenos durante o ciclo estral induzido de ovinos.

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura foi redigida em seis tópicos, compreendendo (1) ciclo estral em ovinos, (2) os hormônios esteróides, (3) metabolização dos hormônios esteróides (4) monitoramento não invasivo no estudo da função endócrina (5) metodologias analíticas, (6) pequenos ruminantes como modelo experimental para cervídeos.

2.1 Ciclo Estral em Ovinos

As variações de ambiente nas regiões temperadas são muito mais marcantes do que as observadas nos trópicos. Nas regiões de latitude elevada, bons exemplos são a drástica alteração existente no fotoperíodo e a elevada amplitude térmica anual. Já nas regiões próximas à linha do Equador, bom exemplo é a existência das estações chuvosa e seca. Os animais, por sua vez, respondem à essas variações de ambiente, tendo como objetivo a manutenção da espécie. Por esse motivo, ovinos lanados, típicos das regiões temperadas, são inférteis durante o inverno e retornam à atividade reprodutiva durante o verão e outono, época propícia ao aleitamento das crias e acasalamento.

As variações no fotoperíodo ditam o comportamento reprodutivo estacional dos ovinos, alterando padrões endócrinos, ovulatórios e de comportamento. Dessa forma raças ovinas originadas entre as latitudes 35° N e 35° S tendem a ser poliéstricas anuais, enquanto que as originadas em latitudes superiores a essas tendem a ser poliéstricas estacionais (ROSA; BRYANT, 2003). Além disso, quanto maior a latitude, mais controlados pelo fotoperíodo e mais estacionais são esses animais.

De um modo geral, a raça Santa Inês, originária do Nordeste brasileiro, apresenta características bastante peculiares no que diz respeito aos aspectos reprodutivos. Considerada uma raça anual, as matrizes podem manifestaraios férteis em qualquer época do ano (SASA et al., 2002) não sendo observada a

influência do fotoperíodo. Assim, no caso das raças não estacionais, fatores de nutrição e manejo se sobressaem em relação ao fator época do ano ou fotoperíodo (LINDSAY, 1991).

O número de ondas foliculares em ovinos varia de duas a três ondas por ciclo, mas o modelo predominante do ciclo interovulatório normal é entre 14-19 dias (SASA et al., 2002). Durante o período de anestro sazonal, o ciclo interovulatório e o número de ondas foliculares são mais variáveis (SASA et al., 2002; ROBINSON et al., 2006).

2.2 Os Hormônios Esteróides

Os hormônios esteróides são produzidos em tecidos específicos do corpo e são divididos em duas classes, os hormônios sexuais e progestacionais e os hormônios adrenais. Os hormônios esteróides são derivados do anel estrutural ciclopentanoperidrofenantreno, sendo o colesterol o esteróide de maior prevalência no organismo e precursor de sete classes de esteróides, entre elas os estrógenos e as progestinas, principais hormônios esteróides sexuais femininos (NORMAN; LITWACK, 1997; LITWACK; SCHMIDT, 1998).

Os estrógenos são esteróides que possuem 18 carbonos em sua composição. Entre os vários estrógenos, o estradiol 17- β é o principal, sendo produzido pelas células da teca e da granulosa do folículo ovariano (NORMAN; LITWACK, 1997; ROSENFELD et al., 2001; SANGHA; SHARMA; GURAYA, 2002; LANGE; HARTEL; MEYER, 2003). O hormônio LH estimula a síntese de andrógenos nas células da teca. Os andrógenos passam para as células da granulosa onde serão transformados em estrógenos mediante o processo de aromatização via o complexo enzimático P-450 aromatase, sendo esses estrógenos sintetizados nos ovários e na unidade feto-placenta (quando gestante). (MACKIE, 2001; SANGHA; SHARMA; GURAYA, 2002).

A progesterona é considerada o principal hormônio esteróide da família das progestinas. A conversão do colesterol (27 carbonos) para pregnenolona e então para progesterona (21 carbonos) ocorre devido a atividades enzimáticas, sendo as principais enzimas a P450_{scc} e a 3 β -hidroxiesteróide deihidrogenase (3 β HSD). A

progesterona é produzida principalmente pelos corpos lúteos, ovários e placenta. (NORMAN; LITWACK, 1997), sendo de grande interesse no estudo em fêmeas gestantes.

A progesterona tem sido usada como parâmetro de monitoramento da atividade ovariana pós-parto. A concentração de progesterona é um dos indicativos da ocorrência da ovulação e a presença de corpo lúteo, estando acima de 1,0ng/ml (OLIVEIRA et al., 1992; MAIA; COSTA, 1998; SASA et al., 2002).

Para Thimonier (2000), o aumento do nível sérico de progesterona no tempo médio correspondente a um ciclo estral depois da cobertura ou inseminação artificial permite saber se a fêmea está vazia ou suscetível de estar prenha.

2.3 Metabolização dos Hormônios Esteróides

A via de excreção dos metabólitos hormonais varia entre espécies. Basicamente, os hormônios esteróides, após sua síntese, são imediatamente liberados na corrente sanguínea e, devido à sua intrínseca baixa solubilidade em água, são transportados por proteínas específicas entre as quais se encontram as globulinas carregadoras ou albuminas, atingindo as células-alvo. Depois de produzirem seus efeitos, esses hormônios são transportados principalmente para o fígado, onde sofrem uma biotransformação envolvendo inativação por reações redox (adição de grupos hidroxil, oxidação, epimerização) e posteriormente, conjugação pela sulfação e glucorinização, tornando-os hidrofílicos, aumentando sua solubilidade na água. A partir do fígado, os esteróides podem ser novamente transferidos para o sangue e serem excretados pelos rins de forma conjugada, ou atravessar a membrana do canalículo hepático para as vias biliares, sendo desconjugados pela microbiota intestinal e parcialmente reabsorvidos ou excretados via fezes de forma não conjugada (MACDONALD et al., 1983; ADAMS et al., 1994; PALME et al., 1996; SCHWARZENBERGER et al., 1996; NORMAN; LITWACK, 1997; PALME et al., 1997; LANGE et al., 2003).

Os hormônios esteróides são rapidamente eliminados do sangue. A meia-vida do hormônio é definida pelo tempo em que a concentração plasmática do esteróide

decai pela metade na ausência de uma nova secreção (NORMAN; LITWACK, 1997). As concentrações de esteróides nas fezes exibem um padrão similar àqueles presentes no plasma, porém existe um atraso no aparecimento dessas secreções nas fezes que pode variar de 12 a 24 horas em ruminantes ou de 24 a 48 horas em animais com ceco funcional, devido à correlação existente com o tempo de passagem intestinal da bile até o reto e digestibilidade do alimento (ADAMS et al., 1994; PALME et al., 1996; SCHWARZENBERGER et al., 1996) e quantidade de fezes produzida, como foi observado por RABIEE, MACMILLAN e SCHWARZENBERGER (2001) na espécie bovina.

Os esteróides excretados nas fezes foram estudados por diversos pesquisadores em diferentes espécies (HOLTZ, 1992; SCHWARZENBERGER et al., 1992; SHIDELER et al., 1993; BROWN et al., 1994; WASSER et al., 1994; SCHWARZENBERGER et al., 1996; RABIEE; MACMILLAN; SCHWARZENBERGER, 2001). Observaram que os principais estrógenos fecais são a estrona, estradiol 17- α e estradiol 17- β , sendo similar ao composto plasmático. Lange et al. (2003), relata que o estradiol 17- β pode ser oxidado para formação de estrona, hidroxilado para formação de estriol ou catecol-estrógenos ou epimerizado para formação de estradiol 17- α .

Em ovinos, o estradiol-17 β é convertido principalmente pelo fígado para estradiol-17 α e excretado na bile de forma conjugada. Pequena quantidade de estrógeno é excretada pelas fezes, sendo a maior parte (superior a 80%) excretado na urina em forma, principalmente, de estrona (ADAMS et al., 1994; PALME et al., 1996).

Em contrapartida, a progesterona é metabolizada para hidroxiprogesterona-17 α ou desconjugada pela microbiota intestinal, sofrendo alterações nos carbonos C-5, C-3 e/ou C-20 podendo originar 18 metabólitos diferentes nas fezes (SCHWARZENBERGER et al., 1996). Em geral, os anticorpos para análise dos metabólitos da progesterona fecal identificam a posição C20 da molécula pregnane, ou seja, os anticorpos para progesterona realizam reação-cruzada com 20-oxo-pregnanes, possibilitando o uso de diferentes ensaios para sua mensuração (MACDONALD et al., 1983; BROWN et al., 1994; SCHWARZERBENGER et al., 1996).

Em saliva os hormônios esteróides passam por difusão passiva pelo epitélio da glândula salivar. Na saliva encontramos esses hormônios dissociados das proteínas,

a maioria encontra-se na forma livre. Tanto o estradiol quanto a progesterona podem ser detectados na saliva. As concentrações detectadas para os estrógenos representam, em humanos, 2% do total dos níveis do estradiol sérico. Os níveis de estriol salivar é correlato com os níveis de estriol sérico em mulheres gestantes (FORDE et al., 2006).

Os valores observados para progesterona salivar tiveram uma boa correlação com os níveis séricos de progesterona durante o ciclo menstrual em mulheres. Esses autores citam também que os níveis da progesterona salivar pode ser utilizado no diagnóstico de infertilidade e da função ovariana (FORDE et al., 2006).

Kobelt et al 2003, realizou um estudo objetivando determinar se o manuseio de cães por quatro minutos afetava a concentração de cortisol na saliva e os resultados obtidos demonstraram que até esse período nenhuma alteração significativa foi encontrada.

Um outro estudo foi conduzido por Tiefenbacher et al. 2003, nesse trabalho os autores com base nas análises feitas utilizando amostras salivares de macacos (*Saimiri sciureus*), concluíram que foi possível determinar mudanças nos níveis de cortisol salivar livre em diferentes horas do dia e em resposta a alterações neuroendócrinas, sendo essa matriz considerada eficiente no monitoramento não invasivo nesta espécie.

Atkinson et al. (1999) realizou um estudo com baleias para estabelecer a atividade ovariana anual ou sazonal pela mensurando a progesterona no plasma, muco vaginal, saliva e secreção ocular para verificar a correlação entre essas matrizes. Nenhuma correlação significativa foi encontrada entre as concentrações de progesterona plasmática com as concentrações salivares ou secreção ocular. No entanto, eles observaram correlação entre a concentração de progesterona vaginal e salivar e entre a secreção vaginal e ocular.

Em humanos alguns trabalhos foram desenvolvidos utilizando a saliva para mensuração hormonal da progesterona e do estradiol durante o ciclo menstrual e na menopausa em mulheres (LU et al., 1999; GANN et al., 2001; KIVLIGHAN et al., 2005; CHATTERTON et al., 2005).

2.4 Monitoramento Não Invasivo no Estudo da Função Endócrina

Nas últimas décadas, grandes avanços têm sido feitos no desenvolvimento de técnicas não invasivas para o monitoramento endócrino em diversas espécies de animais domésticos e selvagens. Trabalhos científicos começaram a emergir em meados dos anos 70 demonstrando que metabólitos de esteróides poderiam ser mensurados na urina e/ou fezes em diversas espécies, utilizando-se imunoensaios. As vantagens destas técnicas hoje são bem conhecidas, e eliminam a necessidade de contenção física ou química do animal para um acompanhamento hormonal longitudinal (JOHNSON; GAY, 1981; CLARKE; DOUGHTON, 1983; FULLER et al., 1984; BROWN, 2006).

A compreensão das relações endócrino-reprodutivas em espécies selvagens é freqüentemente difícil, devido aos problemas associados a colheita periódica de sangue para avaliações hormonais. Por essa razão, nos últimos anos várias técnicas de extração e dosagem de hormônios esteróides nas fezes tem sido desenvolvidas. As vantagens da utilização das fezes para estudos envolvendo reprodução e etologia são a fácil obtenção, manuseio, conservação e transporte das amostras, a redução dos riscos causados pela contenção dos animais e a maior confiabilidade dos resultados pela ausência de estresse (KORNDORFER, 1996; SCHWARZENBERGER et al., 1996). Por outro lado, as desvantagens desta metodologia são: a) o grande trabalho laboratorial para preparação das amostras, b) a influência do tempo de defecação nos resultados devido a degradação dos esteróides pelas bactérias e c) a dificuldade de comparação dos resultados de diferentes laboratórios devido as variações entre as técnicas de extração e os anticorpos dos kits de dosagem hormonal (SCHWARZENBERGER et al., 1996).

Outra justificativa para o emprego deste tipo de abordagem é o fato dos dados obtidos representarem a atividade secretora de uma determinada glândula durante um certo tempo, ao invés de episódios isolados como no caso das dosagens sanguíneas (MORAIS, 1999).

Um ótimo indício da aplicabilidade desse tipo de monitoramento endocrinológico em animais silvestres é a determinação de aspectos reprodutivo através dos esteróides fecais em diversas espécies de primatas (LOSKUTOFF et al., 1983; BAMBERG et al., 1991; WASSER et al., 1991; CHAPEAU et al., 1993;

HEISTERMANN et al., 1993; SHIDELER et al., 1993; PRYCE et al., 1994; WASSER et al., 1994; WASSER et al., 1996; STRIER et al., 1999), carnívoros (MONFORT et al., 1989; BROWN et al., 1994; CZEKALA et al., 1994; BROWN et al., 1995; GRAHAM et al., 1995; WASSER et al., 1995; BROWN, 1997; VELLOSO et al., 1998; MORAIS, 1999) roedores (BILLITTI et al., 1998), edentatas (PATZL et al., 1998) e ungulados (BAMBERG et al., 1991; MONFORT et al., 1995; SCHWARZENBERGER et al., 1995; SHAW et al., 1995; BORJESSON et al., 1996; GARROTT et al., 1998; MORROW; MONFORT, 1998; THOMPSON et al., 1998; BERGER et al., 1999; LI et al., 2001; MONFORT, 2003; PICKARD, 2003).

Além disso, pode-se encontrar na literatura diferentes aplicações para análise dos níveis de esteróides fecais, entre elas: diagnóstico de prenhez, caracterização de ciclos ovarianos normais, determinação do tempo de gestação, determinação da ovulação, descrição de perfis hormonais sazonais, determinação de morte fetal intrauterina, sexagem de aves monomórficas, caracterização dos ciclos reprodutivos de machos, comparação dos níveis hormonais e comportamentos sociais e o diagnóstico de anormalidade do ciclo reprodutivo (PETER et al., 1996; SCHWARZENBERGER et al., 1996).

Na tentativa de compreender melhor a excreção desses hormônios em espécies selvagens, Palme et al. (1996), realizaram estudos com infusão de esteróides marcados (^{14}C) utilizando como modelos experimentais os animais domésticos. Neste trabalho notou-se que em ovinos 77% da progesterona é excretada pelas fezes em forma livre e, 89% dos estrógenos são eliminados pela via urinária. Estas observações, segundo o autor, demonstraram ser possível o acompanhamento da endocrinologia reprodutiva de fêmeas e estresse em animais selvagens, incluindo pequenos ruminantes, pela mensuração de metabólitos fecais e urinários.

Particularmente em cervídeos, o monitoramento dos níveis hormonais urinários e fecais tem sido mais aplicados na determinação de prenhes (MONFORT et al., 1989; BAMBERG et al., 1991; RAMSAY et al., 1994; GARROTT et al., 1998; THOMPSON et al., 1998; BERGER et al., 1999) na avaliação da atividade ovariana (RAMSAY et al., 1994; SCHWARZENBERGER et al., 1995; SHAW et al., 1995; MORROW et al., 1998; PEREIRA et al., 2006).

Há poucos trabalhos utilizando fezes de ovinos para estudo hormonal (PELLETIER et al., 2003; SCHOENECKER et al., 2004). Holtz, em 1992, investigou

a possibilidade da quantificação de estrógenos nas fezes para diagnóstico de prenhez em ovinos, e demonstrou diferença entre as fêmeas gestantes e não gestantes a partir da sétima semana de gestação. Em relação a outras espécies, as fezes de ovinos apresentam-se firmes e em pellets, na maioria das vezes sem odor fétido, tornando mais conveniente a sua colheita, manuseio e estocagem.

Em estudo recente, Reh binder e Hau (2006) avaliaram o stress em renas (*Rangifer tarandus tarandus*) quantificando o cortisol e seus metabólitos imunoreativos e imunoglobulinas em soro, saliva, urina e fezes. Os autores não conseguiram obter resultados satisfatórios na dosagem hormonal na matriz salivar, sugerindo o desenvolvimento de imunoensaios mais específicos.

2.5 Metodologias Analíticas

A seguir descrevemos os principais imunoensaios empregados nas análises hormonais.

2.5.1 Radioimunoensaio

Nos últimos anos, vários métodos imunométricos têm sido amplamente utilizados para detectar e medir os hormônios nos líquidos biológicos. Os princípios do radioimunoensaio (RIE) foram estabelecidos em 1960 por Solomon Berson e Rosalyn Yalow, em Nova York, e por Roger Elkins, em Londres. Os pesquisadores americanos chamaram o método de radioimunoensaio e o inglês de análise de saturação. Ambos os métodos se baseiam no uso de um agente ligante específico e de hormônios radioativos como traçadores, para medir a concentração de substâncias até então não mensuráveis pelos métodos bioquímicos disponíveis (THORELL; LARSON, 1978).

Segundo os princípios desses métodos, uma quantidade fixa de hormônio radioativo compete com o hormônio a ser medido (idêntico ao radioativo) por um número limitado (saturado) de sítios de ligação de um agente ligante de alta

afinidade e especificidade pelo hormônio em questão. A concentração de um determinado hormônio pode ser determinada em amostras de fluídos e extratos biológicos (THORELL; LARSON, 1978).

A maioria dos conjuntos diagnósticos comerciais disponíveis no mercado foi desenvolvida para avaliação quantitativa de hormônios no soro humano. Os anticorpos de alta especificidade desses kits comerciais não são em sua maioria tão eficientes na detecção dos metabólitos por apresentarem baixa porcentagem de reação-cruzada com os principais metabólitos encontrados nos extratos de outras matrizes biológicas. O conjunto diagnóstico comercial para dosagem de progesterona tem apenas 18,9% de reação cruzada com outros esteróides segundo protocolo fornecido pelo fabricante (DPC Medlab[®] Los Angeles, CA, USA).

O RIE utiliza material radioativo o que requer licenças especiais junto aos órgãos reguladores como a Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN). São gerados rejeitos radioativos que devem permanecer armazenados no laboratório por um período de 60 dias para o decaimento da meia vida do ¹²⁵I, para que depois possam ser descartados. Elevado custo por amostra dosada, chega a custar em média 80% mais se comparado com outras metodologias imunométricas, como o enzimaímunoensaio (EIE).

Com o desenvolvimento de programas de responsabilidade ambiental, alternativas a esse método radioativo foram desenvolvidas para a quantificação hormonal em soro humano, como o enzimaímunoensaio (EIE), a quimiluminescência e a espectrometria de massa. Para uso veterinário o radioímunoensaio ainda é utilizado para quantificação de hormônios, embora os trabalhos publicados recentemente apontem para uma substituição gradativa dessa metodologia, com grande destaque para os projetos com animais silvestres (SONGSASEN et al., 2006; PEREIRA et al., 2006).

2.5.2 Enzimaímunoensaio

As enzimas são os marcadores mais utilizados na atualidade, com as vantagens de não apresentarem riscos associados à exposição de radioisótopos, bem como a possibilidade da amplificação catalítica e da associação com outros

marcadores, como por exemplo, os quimioluminescentes e fluorescentes, resultando em ensaios de baixo limite de detecção (TSUJI, 1989; JOHANNSSON, 1991).

O exemplo significativo de enzimaímunoensaios (EIE) heterogêneos é o método que emprega anticorpos imobilizados em placa de poliestireno com número variável de poços de ensaio. Em protocolo clássico o método é realizado em 8 etapas: 1-ativação da placa, 2-lavagem, 3-imobilização dos anticorpos, 4-lavagem, 5-incubação, 6-lavagem, 7-adição de substrato cromogênico e 8-leitura óptica dos poços. Este sistema de placas possibilita a realização do ensaio de maneira com que garanta a uniformidade de todas as etapas tanto para amostras e referências, condição essencial para confiabilidade dos dados. Outro ponto muito importante é que devido a alta sensibilidade do método, o mesmo é feito em micro escala, o que o torna bastante econômico dado a reduzida quantidade de reagentes utilizados, além da rapidez do método (JOHANNSSON, 1991, ZIEGLER, 2005).

Esse sistema de análise pode operar tanto de forma competitiva ou não competitiva. Na versão competitiva, antígenos marcados com enzimas competem com antígenos livres (analito) por número limitado de anticorpos imobilizados. Atualmente utilizam-se, tanto para ensaios competitivos, quanto não-competitivos, sistemas que fazem, além de leitura automatizada dos diferentes poços, diluições em série e réplicas das amostras (JOHANNSSON, 1991).

A maioria dos EIE utiliza anticorpos específicos para hormônios esteróides não metabolizados ou conjugados de esteróides metabolizados, o que os torna mais aplicáveis para a mensuração de hormônios esteróides circulantes no sangue ou metabólitos conjugados na urina, respectivamente. Entretanto, fezes são mais fáceis de coletar do que soro ou urina, sendo a análise de esteróides fecais o método preferencial para o monitoramento não invasivo da função ovariana em animais selvagens de cativeiro ou de vida livre (CZEKALA et al., 1986; LASLEY, KIRKPATRICK, 1991; MUNRO et al., 1991).

Enzimaímunoensaios para progestágenos foram usados com sucesso no monitoramento não invasivo da função endócrina durante o ciclo estral, gestação, e período pós-parto de veados (*Mazama guazoubira*) (PEREIRA et al., 2006).

O trabalho desenvolvido por Gudermuth (1998) indica que os eventos hormonais ocorridos durante o ciclo reprodutivo do cão doméstico apresentam reflexos nas concentrações de esteróides fecais, resultados estes obtidos através da técnica de EIE.

Esses ensaios enzimáticos têm sido usados com sucesso para quantificação de metabólitos de progesterona em fezes de animais de produção como vacas de corte, com o objetivo de facilitar o manejo e permitir o monitoramento do ciclo ovariano. Isobe et al. (2005) conclui que o EIE é um ótimo método para a mensuração de progesterona fecal em gado de corte.

Este tipo de ensaio permite um resultado rápido, sensível a concentrações de progesterona plasmática inferior a 1.0ng/ml, é relativamente mais barato e pode ser realizado com maior facilidade, até mesmo em trabalhos a campo (SINGER, et al., 2004).

2.6 Pequenos Ruminantes como Modelo Experimental para Cervídeos

A família Cervidae surgiu no início da fase Oligocene, há 35 milhões de anos, na Ásia, e no final da fase Miocene divergiu-se em três subfamílias: Muntiacinae, Cervinae e Capreolinae. A família Cervidae antecipou a Bovidae surgindo primeiramente na Europa no início da fase Miocene, 10 a 25 milhões de anos atrás, e rapidamente se distribuiu pelo mundo. Desta forma, o Cervídeo representa a central descendência de qualquer outro ruminante, o Bovídeo (bovinos, ovinos, caprinos e antílopes) e Girafídeo (girafas) (FLINT, 1996).

Os hormônios não permanecem nos fósseis, dificultando o estudo da endocrinologia reprodutiva de ancestrais primitivos de Cervídeo, Bovídeo e Girafídeo. Porém, comparando os modelos reprodutivos desses grupos, observam-se características semelhantes. Atualmente, estes estudos têm sido realizados com o uso de identificação de genes pelo sequenciamento do DNA, utilizando a técnica de PCR (polymerase chain reaction) (FLINT, 1996; HASSANIN; PASQUET; VIGNE, 1998; HIENDLEDER et al., 2002).

Existem muitos paralelos no ciclo reprodutivo entre a família de Cervídeos e de Bovídeos, como por exemplo, a função do corpo lúteo durante o ciclo e o início da prenhez. No Brasil, as fêmeas da espécie *Ozotoceros bezoarticus* (veado campeiro) são poliétricas, com ciclos estrais de aproximadamente 21 dias (DUARTE; GARCIA, 1995), período de gestação em torno de sete meses e concentração de

partos de agosto a outubro, com a maioria dos neonatos aparecendo no mês de agosto (PINDER, 1992).

Ropstad et al. (1996) e Ropstad (2000) descrevem aspectos reprodutivos em fêmeas de rena (*Rangifer tarandus tarandus*), relatando diversas semelhanças com as espécies ovina e caprina. Entre elas, a sazonalidade, com atividade ovariana cíclica coincidindo com a diminuição do fotoperíodo no outono/inverno; o comprimento do ciclo estral, o qual dura por volta de 20 dias; os aspectos endocrinológicos e tratamentos com hormônios exógenos. Blom; Sjaastad e Jacobsen (1983) observaram semelhanças com as espécies ovina e bovina na concentração de progesterona e estradiol durante a prenhez em renas.

Objetivos

3 OBJETIVOS

- Demonstrar a aplicabilidade da técnica de radioimunoensaio (RIE), utilizando-se conjuntos de diagnósticos comerciais destinados a quantificar hormônios em soro humano, para quantificar estrógenos e progestinas em fezes, saliva e urina em ovinos.
- Correlacionar os perfis sérico, fecal, urinário e salivar de progesterona e seus metabólitos estabelecidos durante o ciclo estral induzido em ovinos por radioimunoensaio (RIE).
- Correlacionar os perfis sérico, fecal, urinário e salivar de estradiol e seus metabólitos estabelecidos durante o ciclo estral induzido em ovinos por radioimunoensaio (RIE).
- Demonstrar a aplicabilidade da técnica de enzaimunoensaio (EIE) para quantificar progestinas em saliva e fezes de ovinos utilizando-se amostras previamente validadas pelo RIE.

Material e Método

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP).

4.1 Animais e Instalações Experimentais

Foram utilizadas 08 ovelhas pertencentes ao plantel do VRA. Todas as fêmeas eram adultas, pesando entre 44 e 56kg, clinicamente sadias ao exame físico geral e sexualmente madura. Todos os animais ficaram alojados conjuntamente em uma baia coberta (3mx4mx4m) provida de piso de concreto, cocho para ração total, saleiro e bebedouro. Durante todo o período de colheita das amostras as ovelhas foram mantidas sem a presença de machos.

4.2 Indução e Sincronização do Estro

Antes do início da fase de colheita das amostras, todos os animais foram submetidos à indução e sincronização do estro, mantendo-se, por 12 dias, uma esponja vaginal (Progespon[®] – Acetato de Medroxiprogesterona – Tecnopec), além da aplicação intramuscular (IM) de 400UI de gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) (Novormon[®] - Tecnopec), após a retirada da esponja no D12. Conforme apresentado no esquema 1.

Esquema 1 – Esquema de indução e sincronização do estro em ovinos através da utilização de hormônios exógenos.

4.3 Colheita e Armazenamento das Amostras

Todas as matrizes biológicas desse experimento foram colhidas paralelamente, na seguinte ordem: soro, fezes, urina e saliva. As amostras foram colhidas diariamente no período da manhã entre 9:00h e 11:30h, durante 60 dias. As matrizes biológicas ficaram armazenadas no Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH) / FMVZ-USP, em freezer à -20°C, onde permaneceram armazenadas até as etapas subseqüentes de extração e dosagens hormonais.

As amostras séricas foram obtidas por punção da veia jugular externa, após o preparo do local com álcool iodado, utilizando-se tubos secos de vidro (10mL) com tampas à vácuo. O sangue foi em seguida levado ao LDH, onde foi centrifugado a 1500g durante 15 minutos (Centrífuga Excelsa® II, modelo 206 MP - Fanem®), o soro resultante foi transferido para microtubos de 1,5mL de polietileno (Axygen®), devidamente identificados quanto ao nome do animal e data da colheita, e foram armazenados em *freezer* a -20°C.

As amostras fecais foram colhidas uma vez ao dia diretamente da ampola retal e unidas para formar uma amostra compacta e acondicionadas em sacos hermeticamente fechados. Para a etapa de liofilização, as amostras foram transferidas para tubos de polipropileno com tampa (12x75mm), resistentes a baixas temperaturas, devidamente identificados e armazenados em freezer a -20°C.

As amostras urinárias foram colhidas através de sondagem uretral asséptica, utilizando-se mandril e sonda uretral de PVC nº 6, atóxico siliconizada (EMBRAMED®), e armazenadas em microtubos de 2,0mL de polietileno (Axygen®). Uma alíquota de cada amostra urinária foi separada e enviada ao Laboratório de

Análises Clínicas do Departamento de Clínica Médica da FMVZ/USP para determinação das concentrações de creatinina. A creatinina urinária foi determinada segundo o método descrito por Lutsgarten e Wenk (1972), utilizando o analisador bioquímico automatizado (Marca MAS, modelo Lyasis, Itália). Os valores individuais de creatinina foram utilizados na correção dos valores obtidos na dosagem hormonal das amostras urinárias. Essa correção é feita para impedir que as variações de volume da urina possam influir nos valores de hormônio mensurados, pois a creatinina representa um índice de filtração glomerular, que não sofre alterações mesmo que os volumes urinários sejam diferentes. Desta forma, os resultados finais para matriz urinária foram expressos em ng/mg de Creatinina (Cr).

As amostras salivares foram obtidas com a utilização de algodão estéreis, colocados diretamente na parede interna da boca dos animais. Após alguns segundos o pedaço de algodão foi retirado e centrifugado por 1500g durante 15 minutos (Centrífuga Excelsa[®] II, modelo 206 MP - Fanem[®]), e a saliva resultante acondicionada em microtubos de 1,5mL de polietileno (Axygen[®]), essas amostras foram devidamente identificadas e armazenadas em freezer à -20°C.

4.4 Processamento das Amostras

À seguir abordaremos como cada matriz biológica foi processada.

4.4.1 Preparação das amostras fecais

Todas as amostras foram liofilizadas com o auxílio do aparelho evaporador giratório tipo Speed vac (Speed vac – Sc110, Savant[®]). A liofilização de cada amostra padroniza o peso do material fecal utilizado e garante a ausência de ação bacteriana, uma vez que estas necessitam de água para o seu desenvolvimento.

4.4.2 Extração das amostras fecais

Encontramos na literatura diversos protocolos de extração hormonal em fezes, sendo que os principais pontos testados nesses protocolos são a utilização de amostras fecais úmidas ou liofilizadas, o tipo de solvente orgânico empregado e suas concentrações, número de agitações e centrifugações realizadas para separação dos hormônios presentes no material fecal. No Laboratório de Dosagens Hormonais, têm-se estudado diferentes protocolos de extração de hormônios fecais em diversas espécies animais.

A metodologia empregada na extração dos metabólitos fecais foi de acordo com a técnica descrita por Graham et al., 2001. A escolha dessa metodologia de extração hormonal foi baseada nos resultados obtidos por Chelini, 2006 que testou três protocolos mais utilizados, sendo que a taxa de recuperação hormonal obtida para progesterona foi de 80,5% em ovinos, indicando a eficiência desse protocolo.

Após a homogeneização de cada amostra fecal colhida, conforme sugerido por Millspaugh e Washburn (2003), alíquotas de 0,2g de fezes liofilizadas foram colocadas em tubos de 15mL e adicionados 5mL de etanol (Etanol, P.A. - Merck®) a 80% (80%etanol:20% água destilada). Os tubos foram fechados e agitados suavemente num homogeneizador de sangue (AP22, Phoenix, Araraquara, Brasil) por 15horas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1500g por 15 minutos (Centrífuga Excelsa II, modelo 206 MP - Fanem®) e o sobrenadante resultante foi transferido para tubos de polipropileno e conservados a -20°C até a realização dos ensaios hormonais. Para esta etapa, as amostras foram diluídas em tampão gelatina [NaPO₄ (13,8g), NaCl (9,0g), azida sódica (1,0g) e água destilada (1000ml), pH 7,0], na proporção de 1/10.

4.4.3 Transformação das concentrações determinadas por RIE

As concentrações determinadas primariamente por RIE foram expressas para progesterona em ng/mL e para estradiol em pg/mL. Para melhor adequação dos resultados ao extrato fecal do qual ele foi obtido, foi necessária sua conversão para

ng/g de fezes secas (fs). Portanto, os resultados obtidos foram transformados pelas seguintes equações:

Equação aplicada nos resultados obtidos para P₄ :

$$CF = \frac{C \times V_{fe} \times D}{P_i}$$

Equação aplicada nos resultados obtidos para E₂ :

$$CF = \frac{C \times V_{fe} \times D}{P_i} / 1000$$

CF = concentração final;

C = concentração fornecida pelo RIE;

V_{fe} = volume das fezes ao final da etapa de extração;

D = diluição empregada;

P_i = peso inicial

4.4.4 Preparação das amostras urinárias

A maioria dos hormônios esteróides encontrados na urina não estão na forma livre. Existem descritos na literatura alguns procedimentos que permitem a separação desses esteróides conjugados, glucoronídeos e sulfatados, de acordo com aqueles que ocorrem de forma livre e que são solúveis em água e nos solventes. As amostras urinárias foram submetidas então, a duas metodologias de extração distintas a Hidrólise Urinária e a Solvólise.

A primeira metodologia aplicada foi a Hidrólise Urinária com intuito de desconjugar os esteróides, segundo o protocolo do fabricante do conjunto diagnóstico comercial (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA). Em tubos de ensaio de vidro (15mL), devidamente identificados, foram colocadas alíquotas de 1,0mL de urina, ao qual foram adicionados 200µL de HCl concentrado

(12N), em seguida os tubos foram fechados e levados para incubação em banho de água fervente (QUIMIS[®]) por 15 minutos. Para etapa de dosagem hormonal, cada amostra hidrolisada foi diluída com o calibrador zero (soro humano processado). Esse calibrador foi fornecido pela empresa.

A segunda técnica testada foi a Solvólise, segundo metodologia descrita e modificada por Ziegler et al., 1996. Segundo os autores, a solvólise permite a quebra da ligação dos hormônios conjugados (sulfatados e glucoronídeos) considerados mais estáveis (fortes). Em tubos de vidro (12mL), identificados individualmente, foram colocados uma alíquota de 500µL de cada amostra urinária (100µL:400µL água tipo 1). Foram acrescentados em cada amostra, 100µL de NaCl saturado, 50µL de 2.5M H₂SO₄ e 4mL de acetato de etila, o material foi homogeneizado em aparelho vortex (Phoenix, MOD T 56) por 1 minuto e incubados overnight a 40°C em banho-maria (QUIMIS[®]). No dia seguinte, após esse período de incubação, foram adicionados mais 4,0mL de acetato de etila, agitados no aparelho MultiVortex (VWR Scientiic Products, VX -2500) por 5 minutos, e centrifugados por 2 minutos. a 1000g (Centrífuga Excelsa II, modelo 206 MP - Fanem[®]). Ao final, o sobrenadante foi transferido para tubos limpos e secos por completo no fluxo (LÁCTEA) sob ar comprimido (MSI 5,2 ML/100). O extrato seco resultante foi reconstituído em 500µL de etanol (Etanol, P.A. - Merck) a 90% (90% etanol:10% água tipo 1). Para etapa das dosagens hormonais, as amostras foram diluídas em tampão gelatina [NaPO₄ (13,8g), NaCl (9,0g), azida sódica (1,0g) e água destilada (1000ml), pH 7,0], na proporção de 1/10.

4.4.5 Preparação das amostras salivares

Todas amostras de saliva antes da etapa hormonal, foram centrifugadas por 10min. a 2500g (Centrífuga eppendorf, modelo 5403).

4.5 Dosagens Hormonais

As técnicas utilizadas para mensuração hormonal nas matrizes biológicas utilizadas neste experimento foram realizadas no LDH e estão descritas a seguir.

4.5.1 Análises Hormonais por Radioimunoensaio (RIE)

Para dosagem da progesterona e seus metabólitos no soro, fezes, urina e saliva e do estradiol e seus metabólitos nas fezes, urina e saliva; utilizou-se a técnica de radioimunoensaio (RIE) em fase sólida, por meio de conjunto diagnóstico comercial da DPC[®] (COAT-A-COUNT, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA) desenvolvido para avaliação quantitativa de progesterona (P_4) e estradiol (E_2) no soro humano, e validado previamente para uso em soro de ovinos por Garófalo e Tasende, 1996.

A quantificação do estradiol sérico também foi realizada pela técnica de RIE utilizando-se o conjunto comercial diagnóstico estradiol 3^o geração duplo anticorpo da DSL[®] - 39100 (Diagnostic System Laboratories, Webster, Texas, USA) devido a sua ultra-sensibilidade. Validado previamente para o uso em soro de ovinos por Araújo, 2006.

Estes conjuntos diagnósticos utilizam como elemento traçador o hormônio marcado com ^{125}I e apresentam pouca reação cruzada, com os metabólitos específicos para cada hormônio estudado (Tabela 1 e 2). Os ensaios hormonais foram realizados de acordo com o protocolo fornecido por cada fabricante, exceto os ensaios realizados para dosagem de progesterona e estradiol que mediram a concentração salivar.

Tabela 1- Percentual de reações cruzadas do conjunto diagnóstico comercial para Radioimunoensaio para dosagem de progesterona Coat-a-Count da marca DPC®.

% de reação cruzada	Esteróide
100	Progesterona
9,0	5 α Pregnanediona
3,4	17 α Hidroxiprogesterona
3,2	5 β Pregnanediona
2,2	11-Deoxicorticosterona
0,9	Corticosterona
0,1	Pregnenolona
0,05	5 β -pregnane-3 α -ol-20-one
0,05	5-pregnane-3 β -ol-20-one-sulfato

Tabela 2 - Percentual de reações cruzadas dos conjuntos diagnósticos comerciais para Radioimunoensaio para dosagem de estradiol Coat-a-Count da marca DPC® e para estradiol da marca DSL®.

Estradiol Coat-a-Count DPC®	
% de reação cruzada	Esteróide
100	Estradiol 17 β
10,0	Estrona
4,4	d – Equilenina
1,8	Etrona- β -D-glucoronide
0,80	Equilina
0,58	Sulfato de estrona

Estradiol 3ª geração DSL® - 39100	
% de reação cruzada	Esteróide
100	Estradiol 17 β
6,9	Estrona
0,27	Estradiol 17 β -3-glucuronide
0,03	Equilina
0,40	Equilenina

4.5.1.1 Ensaios de Estradiol e Progesterona para matriz salivar

A metodologia empregada para determinação dos níveis salivares de estradiol e de progesterona foi de acordo com a técnica descrita por Schultheiss et al., 2003.

Nos ensaios de estradiol preparamos uma diluição com água destilada de 1/80, para todos os padrões e controles (Tabela 3). Foram pipetados um volume de 108 μ L dos padrões, controles e amostras nos tubos e logo após 1mL do traçador

também foi adicionado. Todos os tubos foram incubados em banho-maria por 1 hora a 37°C.

Para determinar os níveis salivares de progesterona, preparamos também uma diluição com água destilada de 1/80, para padrões e controles (Tabela 4). Pipetamos um volume de 104µL dos padrões, controles e amostras nos tubos e logo após adicionamos 1mL do traçador. Todos os tubos foram incubados overnight em temperatura ambiente.

A linearidade foi avaliada mensurando-se o estradiol e a progesterona em uma amostra de valor conhecido diluída em 1:2, 1:4 e 1:8.

Tabela 3 – Valores obtidos com a diluição da curva padrão fornecida pelo fabricante do conjunto diagnóstico comercial para dosagem de estradiol.

curva padrão do Kit (pg/mL)	curva padrão diluída 1/80 (pg/mL)
0	0
20	0,25
50	0,625
150	1,875
500	6,25
1800	22,5
3600	45,0

Tabela 4 – Valores obtidos com a diluição da curva padrão fornecida pelo fabricante do conjunto diagnóstico comercial para dosagem de progesterona.

curva padrão do Kit (ng/mL)	curva padrão diluída 1/80 (pg/mL)
0	0
0,1	1,25
0,5	6,25
2,0	25
10,0	125
20,0	250
40,0	500

4.6 Controle de qualidade

Todos os parâmetros de controle de qualidade dos ensaios hormonais foram analisados conforme rotina e empregada no LDH, ou seja, foram calculados o coeficiente de variação intra e inter-ensaio, utilizando valores altos e baixos, no início e fim de cada ensaio. Analisamos a porcentagem de ligação B/B0, sensibilidade e dose mínima detectada. Além disso, nos ensaios realizados para a matriz fecal e urinária, utilizamos como controle um “pool” de amostras que foi dosado em todos os testes hormonais; pois essas amostras biológicas foram submetidas a processos de extrações e diluições.

4.7 Validação Laboratorial

Foi realizada a validação dos conjuntos diagnósticos comerciais DPC® para uso em amostras fecais, urinárias e salivares de fêmeas de ovinos (*Ovis aires*), utilizando-se o método de paralelismo, descrito abaixo.

Paralelismo utilizando matriz íntegra: indica se o material utilizado está interferindo na ligação antígeno-anticorpo. Foi utilizado um “pool” de amostras de baixa concentração hormonal (valores próximos aos limites inferiores da curva-padrão), nesta amostra adicionamos valores conhecidos dos hormônios estudados a fim de aproximá-los dos pontos da curva-padrão.

4.7.1 Validação Fisiológica

Para realização da validação fisiológica foram utilizadas amostras sequenciais oriundas de momentos fisiológicos distintos dos animais estudados nas diversas

matrizes usadas neste experimento. Essa validação indica se as concentrações hormonais obtidas dos esteróides e seus metabólitos refletem a função gonadal.

4.8. Alinhamento dos ciclos ovarianos

No alinhamento dos ciclos ovarianos considerou-se o dia zero (D0) como o primeiro valor igual ou acima de 1,0ng/mL de progesterona sérica. Assim, os dias que antecederam o D0, foram considerados como fase folicular e os dias subseqüentes considerados como fase lútea. Todos os valores obtidos com as outras matrizes biológicas foram alinhados de acordo com esse critério.

4.9 Análises hormonais por Enzimaimunoensaio (EIE)

Foram realizados ensaios de validação laboratorial e fisiológica para dosagem de progesterona e seus metabólitos em fezes e saliva de ovinos por EIE baseados nos procedimentos descritos para outros mamíferos (MUNRO; STABENFELDT, 1984; ILLERA et al, 2003; PEREZ, G.C. et al., 2004). Para quantificação da P₄ e seus metabólitos utilizamos o anticorpo (Ac) monoclonal anti-progesterona clone 425 (CL 425), a progesterona conjugada 3-O-carboxymetiloxime (HRP) e o padrão de progesterona (Progesterone, minimum 99%, cód P0130 – Sigma-Aldrich). O Ac e os HRP foram fornecidos pela Dra Coralie Munro (Universidade da Califórnia, Davis, Califórnia, USA) e a reação cruzada desse anticorpo foi previamente descrito por Graham et al., 2001 e constam na tabela 5.

Tabela 5 – Percentual de reações cruzadas do clone nº 425 do anticorpo para progesterona e seus metabólitos segundo descrito por GRAHAM et al., 2001.

Metabólitos de progesterona	Nome comum	Reação cruzada (%)
4- Pregnen-3,20-dione	Progesterona	100
4- Pregnen-3 α -ol-20-one		188
4- Pregnen -3 β -ol-20-one		172
4-Pregnenen - 11 α -ol-3,20-dione		147
5 α -Pregnan-3 β -ol-20-one		94
5 α -Pregnan-3 α -ol-20-one		64
5 α -Pregnan-3,20-dione		55
5 β - Pregnan-3 β -ol-20-one		12,5
5 β -Pregnan-3,20-dione		8,0
4- Pregnen-11 β -ol-3,20-dione		2,7
5 β -Pregnan-3 α -ol-20-one		2,5
5 β -Pregnan-3 α ,20 α -diol		<0,1
5 α -Pregnan-3 α ,20 β -diol		
5 β -Pregnan-3,17-dione	Androstenediona	<0,1
5 β -Pregnan-11 β ,21-diol-3,20-dione	Corticosterona	<0,1

4.9.1 Teste de Titulação

O objetivo do teste de titulação foi determinar a melhor diluição de trabalho do Anticorpo (Ac) em relação ao Conjugado (HRP), por isso foi necessário determinar ambos simultaneamente. Para essa etapa, realizamos um EIE direto confrontando distintas diluições de Ac (1/4000, 1/8000 e 1/10000) e HRP (1/80000 e 1/160000), tendo sido selecionado aquelas que obtivesse uma densidade óptica entre 0,8 e 1,0 em uma leitura a 450nm.

Para montagem da placa para este teste foi utilizado o seguinte delineamento:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12							
A	Br	STD1	STD3	STD5		B0	STD2	STD4		B0	STD2	STD4	HRP						
B	B0	STD1	STD3	STD5		B0	STD2	STD4		B0	STD2	STD4							
C	B0	STD2	STD4	STD6		STD1	STD3	STD5		STD1	STD3	STD5		1/80000					
D	B0	STD2	STD4	STD6		STD1	STD3	STD5		STD1	STD3	STD5							
E	B0	STD1	STD3	STD5		B0	STD2	STD4		B0	STD2	STD4	1/160000						
F	B0	STD1	STD3	STD5		B0	STD2	STD4		B0	STD2	STD4							
G	B0	STD2	STD4	STD6		STD1	STD3	STD5		STD1	STD3	STD5							
H	B0	STD2	STD4	STD6		STD1	STD3	STD5		STD1	STD3	STD5							
Ac					1/4000					1/8000					1/10000				

As colunas 5 e 9 não foram utilizadas nesse ensaio

Br = branco

B0= máxima ligação entre o Ac e o conjugado

STD 1= 0,1pg/poço

STD 2= 1,0pg/poço

STD 3= 10,0pg/poço

STD 4= 100,0pg/poço

STD 5= 1000,0pg/poço

STD 6= 10000,0pg/poço

4.9.2 Desenvolvimento da técnica

As microplacas com 96 poços de alta absorção (NUNC Maxisorb) foram marcadas com uma diluição definida a partir dos testes de titulação. Os anticorpos foram diluídos em tampão (coating buffer; Na_2CO_3 , NaHCO_3 , H_2O , pH9,6) e 50µL do Ac diluído 1/8000 desta solução foi adicionado em todos os poços da placa, menos no primeiro que foi deixado como branco. As placas foram cobertas com selador plástico (SARSTEDT) e incubadas a 4°C por 16 horas.

As placas foram preenchidas com os padrões e as amostras. A curva padrão (STD) foi mantida dissolvida em etanol (Etanol P.A. Merck) a -20°C. Após evaporação do etanol em fluxo de ar comprimido, cada ponto da curva padrão foi reconstituído na diluição de 1/160000 do HRP progesterona conjugada em EIA buffer (Na_2HPO_4 0.1M; NaH_2PO_4 0.1M; NaCl 0.15M cm 0,1% BSA, pH7,0), tendo como concentrações finais: 0,1, 1,0, 10, 100, 1000 e 10000pg.

Cada amostra de fezes foi processada da seguinte maneira, primeiro foi pipetado num tubo de ensaio de vidro (12mL) 25µL do extrato fecal em seguida,

esses tubos foram deixados na capela para secagem overnight, no dia seguinte essas amostras foram reconstituídas no volume de 150µL do HRP diluído, e para dosagem utilizamos um volume de 50µL da amostra + 50µL de EIA buffer em cada poço.

Para as amostras salivares, foi preparado uma mistura de 50µL de saliva com 250µL do conjugado diluído, e foi utilizado nos ensaios hormonais um volume de 60µL da amostra misturada + 40µL de EIA buffer em cada poço.

Após o tempo de incubação as placas foram submetidas a um ciclo de 03 lavagens na lavadora automática de microplacas (Modelo: Fluido 96-2, Asys Hitech-Anthos®) com uma solução de lavagem (NaCl 1,5M, 0,05% Tween 20), com o objetivo de eliminar o excesso de anticorpos que não tenham se ligado na placa, e em seguida as placas invertidas e secas por completo em papel toalha. A seguir, em cada poço correspondente foram pipetados 50µL dos padrões + 50µL do EIA buffer, 50µL dos controles + 50µL do EIA buffer, e amostras nos volumes citados anteriormente. A placa foi novamente coberta com o selador plástico e incubada por 2 horas em temperatura ambiente. Ao final desse período de incubação foi repetido o procedimento de lavagem para separação das frações de hormônios livres e ligados aos anticorpos da fase sólida.

Após a realização dessas etapas, adicionamos em todos os poços 100µL da mistura do substrato-cromógeno (Enhanced K-Blue® TMB Substrate, Neogen Corporation), deixando reagir por 10-20 min, até que a densidade óptica dos poços B0 ficasse entre 0,8 e 1,0, para frear a reação adicionou-se 100µL da solução stop (H₂ SO₄).em todos os poços.

Uma vez passado o tempo de reação do substrato, procedeu-se a leitura de absorbância com o auxílio de uma leitora automática (Modelo Multi Detector DTX 800, Beckman Coulter®) utilizando o filtro 450nm. Os resultados obtidos foram para saliva foram expressos em pg/poço e para fezes foram corrigidos de acordo com a diluição, peso e volume utilizados, sendo expressos em µg de fezes secas.

4.10 Análise Estatística

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

Através do aplicativo Guided Data Analysis, os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. Caso não obedecessem a estas premissas, foram transformados (logaritmo na base 10 - $\log_{10}X$; Raiz quadrada - $\sqrt{X}$; Quadrado - X^2) e se a normalidade não fosse obtida, empregava-se, então, o procedimento NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica.

Para descrição dos resultados, foram empregadas as médias e seus respectivos erros padrões (média $\pm$ erro padrão da média) dos dados originais e os níveis de significância (p) dos dados originais, quando obedecessem às premissas; dos dados transformados, quando necessária a transformação; e dos dados analisados através da análise não paramétrica, quando não obedecessem às premissas e não houvessem transformações possíveis.

Os testes de correlação de Pearson e Spearman foram utilizados para verificar a relação entre as variáveis paramétricas e não paramétricas, respectivamente. Os resultados foram expressos através do coeficiente de correlação (r), adotando-se como nível de significância (p). $\alpha=5\%$.

As variáveis das concentração sérica de P_4 por RIE, concentração salivar de P_4 por RIE e as concentrações fecais de P_4 por EIE não obedeceram às premissas, sendo a mesma obtida através da transformação para o logaritmo na base 10 de seus valores.

A variável concentração fecal de P_4 por RIE não obedeceu à normalidade dos resíduos, sendo a mesma obtida através da transformação para o inverso de seus valores.

A variável concentração salivar de P_4 por EIE não obedeceram às premissas, não sendo possível transformá-las. Estas variáveis foram, então, analisadas através do PROC NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica, pelo teste de Wilcoxon.

Para verificação de paralelismo nos métodos empregados na validação dos RIE, foi realizado uma análise de regressão simples e o índice de correlação adotado superior a 0,95 (GRAHAM et al., 2001).

Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão foram divididos em sub-capítulos.

5.1 Parâmetros de Qualidade dos Ensaios Hormonais (RIE)

Os ensaios hormonais foram divididos de acordo com cada matriz biológica. O controle de qualidade dos ensaios foi realizado através da análise dos coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaio, sensibilidade e porcentagem de ligação (Tabelas 6 a 13).

Tabela 6 – Controle de qualidade obtido nos ensaios hormonais da progesterona sérica.

<u>HORMÔNIO:PROGESTERONA DPC (matriz sérica)</u>						
	CPM	Cap Lig.	L.N.E	Sensibilidade	CV Intra	CV Intra
Ensaio	total	B/B0	(%)	% (dose)	Baixo	Alto
1	29939,5	52%	0,38%	97,0(0,05)	4,89%	2,14%
2	30236	52%	0,42%	95,3(0,04)	6,27%	2,99%
3	30156,5	52%	0,37%	95,8(0,05)	3,86%	4,49%
4	30236	52%	0,42%	95,4(0,05)	6,27%	2,79%
5	30156,5	52%	0,37%	95,7(0,05)	3,86%	4,49%
CV Inter ensaio					3,08%	2,21%

Tabela 7 – Controle de qualidade obtido nos ensaios hormonais do estradiol sérico.

HORMÔNIO:ESTRADIOL DSL (matriz sérica)

	CPM	Cap Lig.	L.N.E	Sensibilidade	CV Intra	CV Intra
Ensaio	total	B/B0	(%)	% (dose)	Baixo	Alto
1	18584,5	72%	1,60%	94,0(0,75)	0,96%	1,04%
2	17595,5	72%	1,68%	93,1(0,75)	4,62%	8,33%
4	16694	76%	1,21%	98,3(0,75)	1,01%	5,44%
5	15820,5	71%	1,65%	86,7(0,47)	3,81%	0,76%
6	19184,5	61%	1,73%	96,9(0,49)	7,01%	1,40%
CV Inter ensaio					1,91%	0,76%

Tabela 8 – Controle de qualidade obtido nos ensaios hormonais das progestinas fecais.

HORMÔNIO:PROGESTERONA DPC (matriz fecal)

	CPM	Cap Lig.	L.N.E	Sensibilidade	CV Intra	CV Intra
Ensaio	total	B/B0	(%)	% (dose)	Baixo	Alto
1	29883	52%	0,30%	97,0(0,05)	5,30%	2,94%
2	54921	50%	0,34%	94,7(0,05)	7,80%	0,38%
3	53418,5	50%	0,31%	94,5(0,05)	6,28%	0,03%
4	53446	50%	0,61%	95,2(0,05)	3,14%	1,31%
5	22853,5	54%	0,40%	95,2(0,05)	1,35%	9,85%
CV Inter ensaio					2,67%	0,96%

Tabela 9 – Controle de qualidade obtido nos ensaios hormonais dos estrógenos fecais.

HORMÔNIO: ESTRADIOL DPC (matriz fecal)

	CPM	Cap Lig.	L.N.E	Sensibilidade	CV Intra	CV Intra
Ensaio	total	B/B0	(%)	% (dose)	Baixo	Alto
1	20804,5	53%	0,81%	92,2(1,63)	7,90%	5,67%
2	31672	51%	0,59%	92,6(1,40)	5,90%	2,36%
3	33293,5	51%	0,61%	92,6(1,38)	5,49%	4,52%
4	20746,5	53%	0,79%	90,6(2,04)	2,56%	7,82%
CV Inter ensaio					0,02%	3,81%

O resultado obtido do “pool” de extratos fecais utilizado em todos os ensaios evidenciou um coeficiente de variação inter-ensaio de 7% nos ensaios de progestinas fecais e de 11% nos ensaios de estrógenos fecais.

Tabela 10 – Controle de qualidade obtido nos ensaios hormonais das progestinas urinárias.

HORMÔNIO: PROGESTERONA DPC (matriz urinária)

	CPM	Cap Lig.	L.N.E	Sensibilidade	CV Intra	CV Intra
Ensaio	total	B/B0	(%)	% (dose)	Baixo	Alto
1	48009	65%	0,60%	97,2(0,05)	10,42%	10,89%
2	46766	63%	0,62%	97,0 (0,05)	7,85%	5,15%
3	40260	64%	0,44%	93,8(0,04)	9,83%	8,41%
CV Inter ensaio					1,33%	4,95%

Tabela 11 – Controle de qualidade obtido nos ensaios hormonais dos estrógenos urinários.

HORMÔNIO: ESTRADIOL DPC (matriz urinária)

	CPM	Cap Lig.	L.N.E	Sensibilidade	CV Intra	CV Intra
Ensaio	total	B/B0	(%)	% (dose)	Baixo	Alto
1	21152,5	47%	0,59%	95,0(2,57)	4,88%	4,74%
2	26834	45%	0,42%	95,0(1,81)	1,36%	3,13%
3	26228,5	48%	0,65%	94,3(4,87)	9,91%	5,75%
4	24977,5	50%	0,79%	92,9(3,97)	10,13%	6,49%
CV Inter ensaio					1,00%	0,53%

O resultado obtido do “pool” de amostras urinárias utilizado em todos os ensaios evidenciou um coeficiente de variação inter-ensaio de 8,33% para os ensaios de progestinas urinários e de 8,69% para os ensaios de estrógenos urinários.

Tabela 12 – Controle de qualidade obtido nos ensaios hormonais da progesterona salivar.

HORMÔNIO: PROGESTERONA DPC (matriz salivar)

	CPM	Cap Lig.	L.N.E	Sensibilidade	CV Intra	CV Intra
Ensaio	total	B/B0	(%)	% (dose)	Baixo	Alto
1	48009	65%	0,60%	97,2(0,05)	10,42%	10,89%
2	46766	63%	0,62%	97,0 (0,05)	7,85%	5,15%
3	40260	64%	0,44%	93,8(0,04)	9,83%	8,41%
CV Inter ensaio					1,33%	4,95%

Tabela 13 – Controle de qualidade obtido nos ensaios hormonais do estradiol salivar.

HORMÔNIO: ESTRADIOL DPC (matriz salivar)

	CPM	Cap Lig.	L.N.E	Sensibilidade	CV Intra	CV Intra
Ensaio	total	B/B0	(%)	% (dose)	Baixo	Alto
1	23350,5	43%	0,47%	93,47(0,07)	0,79%	0,17%
2	22626,8	43%	0,74%	94,38(0,06)	8,72%	8,83%
3	22887,3	41%	0,54%	94,6(0,06)	6,27%	12,57%
CV Inter ensaio					4,80%	5,73%

5.2 Validação dos Conjuntos Diagnósticos Comerciais - RIE

Foi realizada a validação do conjunto diagnóstico comercial da DPC® em “fase sólida” de progesterona (P₄) e estradiol (E₂) para o uso em amostras fecais, urinárias e salivares de ovinos. Houve paralelismo entre a curva do conjunto comercial e as curvas de diluição das matrizes estudadas. Podemos observar que em todos os testes realizados obtivemos uma alta regressão linear conforme demonstrado na tabela 14. Os resultados foram expressos graficamente e estão representados nas figuras 1 a 6, onde $r=R$ quadrado.

O resultado obtido pela correlação (Pearson) entre a curva modificada (diluída 1:80) e a curva-padrão fornecida pelo kit para os ensaios de progesterona e estradiol salivar foram de $r=0.987$; $p<0,0001$ e $r=0,99$; $p=0,0001$, respectivamente. Os resultados mostraram boa linearidade nos ensaios de progesterona e estrógenos ($r=0,99$ e $r=0,98$, respectivamente) nas faixas de concentrações estudadas. Podemos então sugerir com base nesses resultados que essa modificação realizada foi validada laboratorialmente.

Tabela 14 – Resultados de r^2 quadrado e os valores de significância obtidos na validação dos conjuntos diagnósticos utilizados nas dosagens hormonais da matriz fecal, urinária e salivar.

Hormônio kit/matriz	Valor de r	Valor de p
P ₄ /fezes	0,984	0,0078
E ₂ /fezes	0,974	0,0130
P ₄ /urina	0,984	0,0082
E ₂ /urina	0,974	0,0129
P ₄ /saliva	0,968	0,0163
E ₂ /saliva	0,961	0,0199

Figura 1 – Representação gráfica da curva de paralelismo obtida para progestinas utilizando a matriz fecal.

Figura 2 – Representação gráfica da curva de paralelismo obtida para estrógenos utilizando a matriz fecal.

Figura 3 – Representação gráfica da curva de paralelismo obtida para progestinas utilizando a matriz urinária.

Figura 4 – Representação gráfica da curva de paralelismo obtida para estrógenos utilizando a matriz urinária.

Figura 5 – Representação gráfica da curva de paralelismo obtida para progesterona utilizando a matriz salivar.

Figura 6 – Representação gráfica da curva de paralelismo obtida para estradiol utilizando a matriz salivar.

A validação do conjunto diagnóstico comercial utilizado nesse experimento para progesterona e estradiol foram descritos em diversos trabalhos para quantificação de metabólitos de hormônios fecais em diversas espécies (BERBARE, 2004; NASCIMENTO, 2004; CHELINI et al., 2005; VIAU et al., 2005; GARCIA-FLÓREZ et al., 2005; KUGELMEIER, 2005; BASTOS, 2006; PIZZUTTO, 2006; CAPEZZUTO et al., 2006; SGAÍ, 2007). Os resultados encontrados nesse trabalho demonstram matematicamente que não houve interferência da matriz (fecal, urinária e salivar) na ligação do antígeno (hormônio) com seu anticorpo.

5.3 Validação Fisiológica

Os resultados obtidos demonstraram claramente que foi possível detectar as diferentes concentrações de progesterona ao longo dos ciclos estrais estudados, onde foram observados dois momentos fisiológicos distintos, fase não luteínica (FNL) e fase luteínica (FL). Houve diferença significativa entre as concentrações médias das fases FNL e FL no soro, fezes e saliva, porém não encontramos diferença significativa entre essas fases para matriz urinária (Tabela 15).

Tabela 15 – Concentração média ($\pm$ EPM) da progesterona e seus metabólitos nas diferentes matrizes biológicas analisadas nas fases não luteínica (FNL) e fase luteínica (FL) durante o ciclo estral em ovinos (n=15).

	FNL	FL	<i>p</i>
	Média $\pm$ (EPM)	Média $\pm$ (EPM)	
Soro (ng/mL)	0,55 $\pm$ 0,12	5,48 $\pm$ 0,36	<0,0001
Fezes (ng/g de fs)	433,55 $\pm$ 20,95	960,62 $\pm$ 67,0	<0,001
Saliva (pg/mL)	11,03 $\pm$ 0,90	45,85 $\pm$ 4,9	<0,0005
Urina (ng/mg Cr)	18,38 $\pm$ 1,72	26,17 $\pm$ 4,24	0,09*

- não houve diferença significativa entre as fases analisadas.

Durante a análise dos resultados dos perfis hormonais de progesterona, podemos observar que um dos animais do experimento não respondeu ao protocolo de tratamento hormonal para indução de ciclo do mesmo modo que os outros animais do grupo experimental. Foi detectado um provável período de aciclia de aproximadamente 35 dias, onde os níveis de progesterona sérica ficaram abaixo de 1,00ng/mL, tendo apresentado um único ciclo estral ao final do experimento (Figura 7 e 8). O perfil endócrino encontrado neste animal, pode estar relacionado ao fato de que no momento da aplicação do protocolo de indução e sincronização do cio, os animais estavam em diferentes estágios do ciclo. Segundo Viñoles et al., 2001 o maior intervalo para apresentação do estro após a retirada da esponja pode ser explicado pela presença de um corpo lúteo (CL) funcional. O autor cita também que o aumento desse intervalo pode ser porque o folículo ainda está emergindo no momento da remoção da esponja, e devido a possível presença do CL, que regride em momentos diferentes.

Com base na análise prévia dos resultados obtidos de progesterona mensurados pela técnica de RIE; selecionamos algumas amostras de fezes e saliva para análise hormonal por enzimaímunoensaio.

→ Indica o momento em que o animal apresentou um único ciclo estral

Figura 7 – Demonstração gráfica das concentrações detectadas para a progesterona sérica e seus metabólitos fecais durante um período de 35 dias de provável aciclia encontrada num único animal durante o experimento.

I → Indica o momento em que o animal apresentou um único ciclo estral

Figura 8 – Demonstração gráfica das concentrações detectadas para a progesterona sérica e salivar durante um período de 35 dias de provável aciclia mensurada num único animal durante o experimento.

5.4 Enzimaimunoensaio

A sensibilidade mínima detectada pela técnica de EIE para dosagem de progesterona fecal e salivar foram de 0,17pg/poço e 10,29pg/poço, respectivamente. A porcentagem de ligação (B/B0) foi de 52% (Tabela 16). A figura 9 representa o gráfico obtido no teste de titulação determinada pelo EIE, o eixo X representa os pontos de concentração da curva padrão e o eixo Y a densidade óptica. Na análise dos resultados, a melhor curva obtida foi aquela em que utilizamos o Ac diluído 1/8000 e o HRP 1/160000. Obtivemos correlação entre as concentrações de progesterona medidas na matriz fecal pelos métodos de RIE e EIE ($r=0,78$, $p<0,0001$) e também na matriz salivar pelos dois métodos empregados ($r=0,81$, $p<0,0001$). Foi observado uma diferença significativa entre as fases de aciclia vs ciclando, tendo como variável o efeito da concentração da progesterona $>1,0\text{ng/mL}$ (Figuras 10 e 11, Tabela 17).

Figura 9 – Representação gráfica obtida pelo programa de software acoplado a leitora automática (MOD 800DTX, Beckman Coulter) o eixo Y representa os dados obtidos com a leitura da densidade óptica (OD) e o eixo X representa as concentrações em pg/poço.

Tabela 16 – Tabela com os coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaio de concentrações baixa e alta obtidos nos ensaios da dosagem de progesterona salivar e fecal.

Saliva	Intra-ensaio (%)	Inter-ensaio (%)
10pg/poço	1,26	7,01
100pg/poço	6,67	8,04

Fezes	Intra-ensaio (%)	Inter-ensaio (%)
10pg/poço	1,96	3,20
100pg/poço	8,93	10,11

Figura 10 – Demonstração gráfica das concentrações médias ($\pm$ EPM) das progesterinas fecais mensuradas pelas técnicas de radioimunoensaio e enzima imunoensaio nas fases de aciclia e ciclando.

Figura 11 – Demonstração gráfica das concentrações médias ($\pm$ EPM) da progesterona salivar mensurada pelas técnicas de radioimunoensaio e enzimaímunoensaio nas fases de aciclia e ciclando.

Tabela 17 – Tabela com as concentrações médias ($\pm$ EPM) da progesterona e seus metabólitos mensurados pelas técnicas analíticas de radioimunoensaio (RIE) e enzimaímunoensaio (EIE) e o valor de significância obtido na comparação entre as médias nos momentos fisiológicos distintos estudados (aciclia e ciclando).

RIE			
	Antes X $\pm$ EPM	Depois X $\pm$ EPM	p
Soro (ng/mL)	0,18 $\pm$ 0,03	3,62 $\pm$ 0,76	0,0001
Fezes (ng/g de fs)	287,2 $\pm$ 9,18	650,42 $\pm$ 114,37	0,0003
Saliva (pg/mL)	5,78 $\pm$ 0,9	31,91 $\pm$ 9,83	0,0004
EIE			
	Antes X $\pm$ EPM	Depois X $\pm$ EPM	p
Fezes (μ g/g de fs)	13,25 $\pm$ 0,94	48,74 $\pm$ 10,67	<0,0001
Saliva (pg/pç)	0,27 $\pm$ 0,05	1,80 $\pm$ 0,59	0,033

O resultado obtido pela técnica de enzimaímunoensaio foi satisfatório e está de acordo com os resultados reportados na literatura em outras espécies animais utilizando o mesmo anticorpo. (SCHEIBE, 1999; GRAHAM et al, 2001; PICKARD et al., 2001; SCHOENECKER, et al, 2004; PEREIRA et al., 2006) . Esse experimento permite sugerir que está técnica analítica quantificou as progestinas nas matrizes

fecal e salivar, de forma similar ao obtido pelo RIE. As concentrações mensuradas por ambos os métodos analisados nas duas matrizes biológicas, refletiram as alterações dos níveis de progesterona durante a fase de não atividade e de atividade gonadal na espécie estudada.

5.5 Hidrólise x Solvólise

Foram separadas algumas amostras urinárias para serem submetidas a dois protocolos de liberação dos esteróides conjugados. Os resultados encontrados foram então comparados com a dosagem hormonal obtida da amostra urinária pura, ou seja, aquela matriz controle que não sofreu nenhum processo de extração.

Na análise dos dados obtidos podemos observar que as amostras urinárias puras tiveram um valor médio ($\pm$ EPM) de $5,24 \pm 0,89$ ng/mL Cr, o valor médio obtido pelo protocolo de hidrólise foi $9,45 \pm 3,45$ ng/mg Cr, e o valor médio obtido pelo protocolo de solvólise $1200 \pm 270,45$ ng/mg Cr. Com relação, a esses dados podemos observamos que as concentrações das amostras urinárias puras e submetidos ao protocolo de hidrólise urinária, ficaram bem abaixo quando comparado aos valores obtidos com a dosagem das amostras submetidos ao protocolo de solvólise. Esse resultado indica que provavelmente o protocolo de solvólise foi capaz de desconjugar os esteróides sulfatados e glucoronados de forma mais eficaz do que o protocolo de hidrólise, indicando possivelmente que na matriz urinária de ovelhas existam hormônios conjugados mais estáveis.

5.6 Perfil Hormonal

Neste trabalho, foi observado um total de vinte e dois ciclos ovarianos ($n=22$). O primeiro ciclo ovariano de cada animal desse experimento, detectado logo após a indução do cio foi descartado e seus valores não foram utilizados nas análises hormonais, pois poderiam estar sob o efeito dos hormônios exógenos. Sendo assim, a duração média ($\pm$ EPM) do ciclo ovariano ($n=15$) foi de $17,53 \pm 0,29$ dias, variando

de 15 a 19 dias. A duração do ciclo estral encontrada foi compatível com a esperada pela espécie. Sasa et al. 2002, analisando ciclo estrais em ovelhas lanadas e não-lanadas, não observaram diferença entre raças e a duração do ciclo estral considerada normal foi de 14-19 dias. A partir do alinhamento, considerando $D0 = P4 > 1,0 \text{ ng/mL}$, foi calculada a duração de cada fase do ciclo. A fase não luteínica teve duração média $5,17 \pm 0,19$ dias (variando de 4 a 7 dias) e a fase luteínica durou em média $12 \pm 0,23$ dias (variando de 10 a 14 dias).

Observou-se uma significativa correlação entre a progesterona e seus metabólitos do soro x saliva, soro x fezes e fezes x saliva, mas não obtivemos correlação entre a matriz urinária com nenhuma matriz, durante os ciclos estrais observados (Tabela 18). Todos os ciclos estrais observados foram representados graficamente para uma melhor visualização do perfil endócrino das matrizes sérica, fecal, urinária e salivar. (Figuras 12 a 14).

Tabela 17 – Representação estatística do coeficiente de correlação realizado pelo teste de *Pearson* entre a concentração de progesterona mensurada nas matrizes sérica, fecal, urinária e salivar durante o ciclo estral em ovinos.

	Fezes (ng/g de fs)	Saliva (pg/mL)	Urina (ng/mg Cr)
Soro (ng/mL)	$r=0,90, p<0,0001$	$r=0,90, p<0,0001$	$r=0,36, p<0,11$
Fezes (ng/g de fs)		$r=0,92, p<0,0001$	$r=0,45, p<0,04$
Saliva (pg/mL)			$r=0,36, p<0,11$

Figura 12 – Perfil das concentrações médias ($\pm$ EPM) da progesterona sérica e seus metabólitos nas fezes de ovinos durante ciclo estral.

Figura 13 – Perfil das concentrações médias ($\pm$ EPM) da progesterona sérica e salivar durante o ciclo estral em ovinos.

Figura 14 – Perfil das concentrações médias ($\pm$ EPM) da progesterona e seus metabólitos nas fezes e saliva durante o ciclo estral em ovinos.

Embora tenha grande correlação, os acontecimentos no soro e nas fezes não são vistos no mesmo dia da colheita, uma vez que a amostra sérica representa o estado momentâneo da progesterona no animal, devido a sua meia vida curta e rápida metabolização como observado por Palme et al., 1996. Nesse mesmo trabalho os autores observaram que em ovinos, utilizando hormônio marcado ^{14}C , a via de eliminação da progesterona é pelas fezes (77%) e a máxima concentração detectada desse hormônio foi 12 horas após a infusão, isso pode explicar os baixa correlação obtida entre soro x urina. A principal desvantagem na análise dos esteróides presente nas fezes é a elevada presença de diferentes metabólitos existentes nessa matriz. Alguns trabalhos descritos na literatura utilizaram técnicas específicas como a cromatografia líquida de alta performace (HPLC) e a espectrometria de massa para a identificação desses metabólitos nessa e em outras espécies (PALME et al., 1996, PALME et al., 1997, SCHWARZERBERGER et al., 1996, SCHWARZERBERGER et al., 1998, GRAHAM, et al., 2001, SCHWARZERBERGER, 2007). Os nossos resultados para análise de progesterona na matriz fecal utilizando o anticorpo anti-progesterona da DPC pode detectar

efetivamente as alterações fisiológicas esperadas durante o ciclo estral na espécie estudada.

Wasser et al. (2000) afirma que o desenvolvimento de um anticorpo específico para os metabólitos excretados por cada espécie é impraticável e sugere, que o desenvolvimento de anticorpos grupo-específicos é mais viável, pois estes reconheceriam uma família de metabólitos ao invés de um esteróide específico. Neste sentido, as dosagens para progesterona na matriz fecal utilizada neste trabalho pela técnica de enzimaensaio estão de acordo com o que foi sugerido.

Apesar dos excelentes resultados obtidos para análise das matrizes fecal e salivar por RIE, sugerimos com base nos resultados obtidos na validação fisiológica que, a técnica de enzimaensaio seja empregada preferencialmente, pois esse imunoensaio não envolve o uso de materiais radioativos, contribuindo assim com a responsabilidade ambiental, promovem a redução de custos, e principalmente por apresentarem uma boa reação cruzada para o grupo específico de esteróides estudados.

A dosagem hormonal na matriz salivar se revelou eficiente como método não invasivo. Essa matriz é estável em relação ao armazenamento -20°C e não foi necessária a utilização de nenhum tipo de extração hormonal (WHEMBOLUA et al. 2006). Obtivemos uma ótima correlação com a matriz sérica e fecal.

A correlação encontrada entre a média das concentrações para estradiol e seus metabólitos obtidos entre soro x fezes foi significativa positiva, porém não obtivemos correlação entre as concentrações quantificadas entre soro x saliva, soro x urina, saliva x fezes. Obtivemos um resultado significativo negativo entre a correlação obtida entre as concentrações hormonais de estrógenos nas matrizes saliva x urina, conforme demonstrado na tabela 18; figuras 15 a 17.

Tabela 18 – Representação estatística do coeficiente de correlação realizado pelo teste de *Pearson* entre as concentrações de estradiol mensurado nas matrizes sérica, fecal, urinária e salivar durante o ciclo estral em ovinos.

	Fezes (ng/g de fs)	Saliva (pg/mL)	Urina (ng/mg Cr)
Soro (ng/mL)	$r=0,74, p<0,0001$	$r=0,37, p<0,09$	$r=-0,15, p<0,50$
Fezes (ng/g de fs)		$r=0,74, p<0,0001$	$r=-0,39, p<0,08$
Saliva (pg/mL)			$r=-0,64, p<0,002$

Figura 15 – Perfil das concentrações médias ($\pm$ EPM) do estradiol sérico e seus metabólitos nas fezes de ovinos durante o ciclo estral.

Figura 16 – Perfil das concentrações médias ($\pm$ EPM) do estradiol e seus metabólitos no soro e na urina de ovinos durante o ciclo estral.

Figura 17 – Perfil das concentrações médias ($\pm$ EPM) do estradiol e seus metabólitos na saliva e na urina de ovinos durante o ciclo estral.

Os eventos observados no sangue foram refletidos nas fezes, porém, visualmente mais discretos em comparação aos achados na progesterona. Palme et al. (1996) observaram que em ovelhas 89% da estrona injetada foi eliminada pela urina, sendo que, apenas 11% desse hormônio marcado foi eliminado pelas fezes.

Os autores desse trabalho relatam também que a máxima concentração dos metabólitos de estrona foi eliminada 12 horas após a infusão do hormônio marcado. Adams et al. (1994) estudando o metabolismo do estradiol em ovinos, observaram maior taxa de excreção do hormônio marcado 24 horas após injeção, levando três dias para chegar aos níveis basais. Além da via de metabolização, outro fator que pode estar associado ao perfil sérico do estradiol encontrado, é o curto período da fase folicular nessa espécie, e provavelmente uma única amostra sérica diária não seja suficiente para a detecção do pico de estradiol pré-ovulatório.

SCHWARZENBERGER et al., 1996 apontam que a determinação do pico de estradiol pré-ovulatório em amostras fecais não teve sucesso em vacas e no alce (MONFORT et al., 1993). Palme et al. (1996), observaram que em ungulados as possíveis razões para falha em detectar o pico pré-ovulatório, são as baixas concentrações de estradiol no plasma, e o fato de que a principal via de excreção do estradiol é a urina.

Faria Jr, 2006 estudando o ciclo estral em caprinos, não obteve correlação do estradiol sérico com os estrógenos fecais ($r=0,01$ a $0,28$), porém obteve uma boa correlação entre a progesterona sérica com as progestinas fecais ($r=0,32$ a $0,84$).

Na análise dos dados obtidos na dosagem dos estrógenos urinários podemos observar que, o conjunto diagnóstico comercial utilizado permitiu detectar a presença de três picos que ocorreram com intervalos de 4 a 5 dias, durante o ciclo estral, sendo que dois foram detectados durante a fase luteínica. Esses picos mensurados podem ter correlação com o momento fisiológico do animal, sendo um reflexo do pico pré-ovulatório e das ondas foliculares que ocorrem normalmente nessa espécie durante a fase luteínica (GONZALEZ-BULNES et al, 2002; TASENDE et al., 2005; VALAREZ et al., 2007). Duggavathi et al, 2005, realizou um estudo temporal que correlacionou a secreção do LH e FSH, com o desenvolvimento dos folículos durante a fase lútea em ovelhas, e os resultados mostram que no fim de cada onda folicular dessa fase ocorre concentração máxima de LH com intervalos de 5 dias.

As figuras abaixo representam uma demonstração gráfica da análise hormonal obtida para cada matriz analisada em relação aos hormônios dosados (Figuras 18 a 21).

Figura 18 – Perfil das concentrações médias do estradiol e progesterona séricas de ovinos durante ciclo estral.

Figura 19 – Perfil das concentrações médias de estrógenos e progestinas fecais de ovinos durante ciclo estral.

Figura 20 – Perfil das concentrações médias de estrógenos e progestinas urinárias de ovinos durante ciclo estral.

Figura 21 – Perfil das concentrações médias de estradiol e progesterona salivar de ovinos durante ciclo estral.

A escolha da matriz biológica mais adequada para mensuração de hormônios esteróides nos trabalhos que envolvam monitoramento não invasivo, dependerá de uma série de variáveis que deverão ser consideradas antes do delineamento experimental. Essa escolha deve levar em consideração a espécie animal, frequência da colheita das amostras (ex: detecção da ovulação), metodologias de extração, via de excreção e se o anticorpo utilizado para as análises hormonais é de fato o mais apropriado.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

Nas condições em que o experimento foi conduzido, podemos inferir que:

Do ponto de vista laboratorial, demonstrou-se que não houve interferência das matrizes fecal, salivar e urinária na ligação de cada um dos hormônios estudados com o respectivo anticorpo, sendo validado o uso do conjunto diagnóstico comercial em fase sólida da DPC® na espécie estudada.

Observou-se correlação significativa positiva entre as concentrações de progesterona e seus metabólitos medidas nas matrizes fecal, salivar e sérica durante o ciclo estral induzido em ovinos.

Observou-se correlação significativa positiva entre as concentrações de estradiol e seus metabólitos medidas nas matrizes sérica e fecal, mas não entre estas concentrações e aquelas medidas na matriz salivar durante o ciclo estral em ovinos.

Não obtivemos correlação entre as concentrações quantificadas na matriz urinária e aquelas quantificadas nas outras matrizes para nenhum dos hormônios estudados.

As correlações significantes observadas entre as concentrações fecais e salivares de progesterona dosadas por radioimunoensaio e enzimaímunoensaio demonstraram a aplicabilidade da segunda técnica para quantificação de progestinas nestas duas matrizes na espécie estudada.

Referências

REFERÊNCIAS

ADAMS, N. R.; ABORDI, J. A.; BRIEGEL, J. R.; SANDERS, M. R. Effect of diet on the clearance of estradiol-17 β in the ewe. **Biology of Reproduction**, v. 51, p. 668-674, 1994.

ARAÚJO, R. C. **Produção de leite e atividade ovariana pós-parto de ovelhas Santa Inês alimentadas com casca de soja em substituição do ferro de "coastcross" (*Cynodon sp*)**. 2006. 89f. Dissertação (mestrado em Agronomia) – ESALQ, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

ASA, C. S.; BAUMAN, J. E.; HOUSTON, E. W.; FISCHER, M. T.; READ, B.; BROWNFIELD, C. M.; ROSER, J. F. Patterns of excretion of fecal estradiol and progesterone and urinary chorionic gonadotropin in Grevy's zebras (*Equus grevyi*): ovulatory cycles and pregnancy. **Zoo Biology**, v. 20, p. 185-195, 2001.

ATKENSON, S.; COMBELLES, C.; VINCENT, D.; NACHTIGALL, P.; PAWLOSKI, J.; BREESE, M. Monitoring of progesterone in captive female False Killer Whales, *Pseudorca crassidens*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 115, p. 323-332, 1999.

BAMBERG, E.; CHOI, H. S.; MOSTL, E.; WURN, W.; LORIN, D.; ARBEITER, K. Enzymatic determination of unconjugated oestrogens in faeces for pregnancy diagnosis in mares. **Equine Veterinary Journal**, v.16, p.537-539, 1984.

BAMBERG, E.; MOSTL, E.; PATZL, M.; KING, G. 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.

BASTOS, A. F. L. **Avaliação endocrinológica da reprodução de muriquis do sul em cativeiro (*Brachyteles arachnoides* - E. GEOFFROY, 1806) por meio de dosagem de metabólitos de esteróides fecais**. 2006. 104f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

BERBARE, P. E. B. **Avaliação longitudinal das concentrações de esteróides fecais em fêmeas de gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*, Lacépède, 1809)**. 2004. 111 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

BERGER, J.; TESTA, J. W.; ROFFE, T.; MONFORT, S. L. Conservation endocrinology: a noninvasive toll to understand relationships between carnivore colonization and ecological carrying capacity. **Conservation Biology**, v. 13, n. 5, p. 980-989, 1999.

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, p. 1023-1028, 1998.

BLOM, A. K.; SJAASTAD, V.; JACOBSEN, E. Plasma levels of progesterone and oestradiol-17 β in reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) during pregnancy. **Acta Veterinaria Scandinávica**, v. 24, p. 287-294, 1983.

BORJESSON, D. L.; BOYCE, W. M.; GARDNER, I. A.; DEFORGE, J.; LASLEY, B. Pregnancy detection in bighorn sheep (*Ovis canadenses*) using a fecal based enzyme immunoassay. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 32, n. 1, p. 67-74, 1996.

BROWN, J. L. Comparative endocrinology of domestic and nondomestic felids, **Theriogenology**, n. 66, p. 25-36, 2006.

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

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

BROWN, J. L.; WILDT, D. E.; GRAHAM, L. H.; BYERS, A. P.; COLLINS, L.; BARRET, S.; HOWARD, J. G. Natural versus chorionic gonadotropin-induced ovarian responses in the clouded leopard (*Neofelis nebulosa*) assessed by fecal steroids analysis. **Biology of Reproduction**, v.53, p. 93-102, 1995.

CAPEZZUTO, A.; CHELINI, M. O. M.; FELIPPE, E. C. G.; OLIVEIRA, C. A.; Correlation between serum and fecal concentrations of reproductive steroids throughout gestation in goats. **Animal Reproduction Science**, *In Press, Corrected Proof*, 2006.

CHAPEAU, C.; KING, G. J.; BAMBERG, E. Fecal estrogens in one primate and several ungulate species during various reproductive stages. **Animal Reproduction Science**, v. 34, p. 167-1785, 1993.

CHATTERTON JR., R. T.; MATEO, E. T.; HOU, N.; RADEMAKER, A. W.; ACHARYA, S.; JORDAM, V. C.; MORROW, M. Characteristics of salivary profiles of oestradiol and progesterone in premenopausal women. **Journal of Endocrinology**, v. 186, p. 77-84, 2005.

CHATTERTON JR., R. T.; ZUJEWSKI, J.; MATEO, E. T.; ENG-WONG, J.; JORDAN, V. C. Effect of raloxifene on salivary sex steroid concentrations in premenopausal women. **Journal of Endocrinology**, v. 191, p. 599-604, 2006.

CHATTERTON JR., R. T.; MATEO, E. T.; HOU, N.; RADEMAKER, A. W.; ACHARYA, S.; JORDAN, V. C.; MORROW, M. Characteristics of salivary profiles of oestradiol and progesterone in premenopausal women. **Journal of Endocrinology**, v. 186, p. 77-84, 2005.

CHELINI, M. O. M. **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.

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, p. 1711-1717, 2005.

CLARKE, I. J.; DOUGHTON, B. W. Effect of various anaesthetics on resting plasma concentrations of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and prolactin in ovariectomized ewes. **Journal of Endocrinology**, v. 98, p. 79-89, 1983.

CZEKALA, N. M.; CALLISON, L. Pregnancy diagnosis in the black rhinoceros (*Diceros bicornis*) by salivary hormone analysis. **Zoo Biology**, v. 15, p. 37-44, 1996.

CZEKALA, N. M.; DURRANT, B. S.; CALLISON, L.; WILLIAMS, M.; MILLARD, S. Fecal steroid hormone analysis as an indicator of reproductive function in the cheetah. **Zoo Biology**, v. 13, p. 119-128, 1994.

DUARTE, J. M. B.; GARCIA, J. M. Reprodução assistida em cervídeos brasileiros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 19; n. 1-2, p. 111-121, 1995.

DUGGAVATHI, R.; BARTLEWSKI, P. M.; BARRETT, D. M. W.; RAWLINGS, N. C. The temporal relationship between patterns of LH and FSH secretion, and development of ovulatory-sized follicles during the mid-to late-luteal phase of sheep. **Theriogenology**, v. 64, p. 393-407, 2005.

FARIA JUNIOR., S. P. **Níveis séricos de progesterona, estrógenos e seus metabólitos fecais durante o ciclo estral de cabras (*Capra hircus*, Linnaeus, 1758)**. 2006. 75f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

FLINT, A. P. F. Palaeoendocrinology, ancient DNA and the oestrus cycle and pregnancy in the Bovidae and Cervidae. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 31, p. 491-494, 1996.

FORDE, M. D.; ECKERT, S. E.; CARR, A. B.; WONG, D. T. Systemic Assessments utilizing saliva: part 1 general considerations and current assessments. **International Journal of Prosthodontics**, v. 19, n. 1, p. 43-52, 2006.

FULLER, G. B.; HOBSON, W.; REVES, F. L.; WINTER, J. S. D., FAIMAN, C. Influence of restraint and ketamine anaesthesia on adrenal steroids and gonadotropins in rhesus monkeys. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 175, p. 487-490, 1984.

GANN, P. H.; GIOVANAZZI, S.; HORN, V. L.; BRANNING, A.; CHATTERTON, R. T. Saliva as a medium for investigating intra- and interindividual differences in sex hormone levels in premenopausal women. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**, v. 10, p. 59-64, 2001.

GARCIA-FLOREZ, M.; OLIVEIRA, C. A.; CARVALHO, H. F. Early effects of estrogen on the rat ventral prostate. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 487-497, 2005.

GARNIERA, J. N.; GREEN, D. I.; PICKARD, A. R.; SHAW, H. J.; HOLT, W. V. Non-invasive diagnosis of pregnancy in wild black rhinoceros (*Dinoceros bicornis minor*) by fecal steroid analysis. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 10, p. 451-468, 1998.

GARÓFALO, E. G.; TASENDE, C.; Uterine estrogen and progesterone receptors in prepubertal ewes: distribution in myometrium, endometrium and caruncles. **Veterinary Research**, n. 27, p. 177-183, 1996.

GARROTT, R. A.; MONFORT, S. L.; WHITE, P. J.; MASHBURN, K.L.; COOK, J.G. One-sample pregnancy diagnosis in elk using fecal steroid metabolites. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 34, n. 1, p. 126-131, 1998.

GONZALEZ-BULNES, A.; GARCIA-GARCIA, R. M.; SOUZA, C. J. H.; SANTIAGO-MORENO, J.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; COCERO, M. J.; BAIRD, D. T. Patterns of follicular growth in superovulated sheep and influence on endocrine and ovarian response. **Reproduction Domestic Animal**, v. 37, p. 357-361, 2002.

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

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

GRANGER, D. A.; CICHETTI, D.; ROGOSCH, F. A.; HIBEL, L. C.; TEISE, M.; FLORES, E. Blood contamination in children's saliva: prevalence, stability and impact on the measurement of salivary cortisol, testosterone and dehydroepiandrosterone. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, p. 724-733, 2007.

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, p. 237-248, 1998.

HASSANIN, A.; PASQUET, E.; VIGNE, J. D. Molecular systematics of the subfamily Caprinae (Artiodactyla, Bovidae) as determined from citocytocrome *b* sequences. **Journal of Mammalian Evolution**, v. 5, n. 3, p. 217-236, 1998.

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

HIENDLEDER, S.; KAUPPE, B.; WASSMUTH, R.; JANKE, A. Molecular analysis of wild and domestic sheep questions current nomenclature and provides evidence for domestication from two different subspecies. **Proceedings of the Royal Society of London**. v. 269, p. 893-904, 2002.

HINDLE, J. E.; HODGES, J. K. Metabolism of oestradiol-17 β and progesterone in the white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 90, p. 571-580. 1990.

HODGES, J. K.; CZEKALA, N. M.; LASLEY, B. L. Estrogen and luteinizing hormone secretion in diverse primate species from simplified urinary analysis. **Journal of Medical Primatology**, v. 8, p. 349-364, 1979.

HOLTZ, W. Pregnancy diagnosis through faecal estrogens in goats. **Endocrinology**, v. 109, p. 240-246, 1992.

HOPPEN, H. O.; DIAZ DE AGUIRRE, L.; HAGENBECK, D.; BOER, M.; SCHWARZENBERGER, F. Progesterone metabolites in elephant faeces. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FAECAL STEROID MONITORING IN ZOO ANIMALS, 1., 1992, Rotterdam. **Proceedings...** Rotterdam: Royal Rotterdam Zoological and Botanical Gardens, 1992. p. 51-54.

ILLERA, J. C.; SILVÁN, G.; MUNRO, C. J.; LORENZO, P. L.; ILLERA, M. J.; LIU, I. K. M.; ILLERA, M. Amplified androstenedione enzymeimmunoassay for the diagnosis of cryptorchidism in the male horse: comparison with testosterone and estrone sulphate methods. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 84, p. 377-382, 2003.

ISOBE, N.; NAKAO, T.; YAMISHIRO, H.; SHIMADA, M. Enzyme immunoassay of progesterone in the feces from beef cattle to monitor the ovarian cycle. **Animal Reproduction Science**, v. 87, p. 110, 2005.

JABBOUR, H. N.; BAINBRIDGE, D. R. J. Deer: reproduction and conservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 31, p. 501-504, 1996.

JOHANNSSON, A. In: "Principles and practice of immunoassay". Pride, C.; Newman, D., Eds Macmillan, New York, 300 p., 1991.

JOHNSON, L. M., GAY, V. L. Luteinizing hormone in the cat. I. Tonic secretion. **Endocrinology**, v. 109, p. 240-246, 1981.

KALLERT, G.; GOTTSCHALK, J.; NEUMANN, G.; EULENBERGER, K.; GRÜN, E. Fortpflanzungsbiologie der Schneegaümse (*Oreamnos americanus*). Ein Beitrag unter besonderer Berücksichtigung der Gestagenkonzentration der Faüzes im Verlauf der Trächtigkeit. **Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Grosstiere – Nutztiere**, v. 30, p. 240-243, 2002.

KIRKPATRICK, J. F.; SHIELE, S. E.; LASLEY, B. L.; TURNER, J. W.; CZEKALA, N. M. Field application of faecal steroid monitoring to free-ranging wildlife. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FAECAL STEROID MONITORING IN ZOO ANIMALS, 1., 1992, Rotterdam. **Proceedings...** Rotterdam: Royal Rotterdam Zoological and Botanical Gardens, 1992. p. 25-33.

KIVLIGHAN, K.T.; GRANGER, D.A.; SCHWARTZ, E.B. Blood contamination and the measurement of salivary progesterone and estradiol. **Hormones and Behavior**, v. 47, p. 367-370, 2005.

KOBELT, A. J.; HEMSWORTH, P.H.; BARNETT, J.L.; BUTTER, K.L. Sources of sampling variation in saliva cortisol in dogs. **Research in Veterinary Science**, v. 75, p. 157-161, 2003.

KORNDÖRFER, C. M. Hormônios sexuais nas fezes: opção para estudos reprodutivos e etiológicos de animais silvestres. **Anais de Etiologia**, v. 14, p. 151-158, 1996.

KUGELMEIER, T. **Avaliação endocrinológica do ciclo ovariano de macaco bugio (Alouata caraya - HUMBOLDT, 1812) por meio de extração e dosagem de**

metabólitos de esteróides fecais. 2005. 120 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

LANGE, I. G.; HARTEL, A.; MEYER, H. H. D. Evolution of oestrogen functions in vertebrates. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 83, p. 219-226, 2003.

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 Wildlife Medicine**, v. 22, p. 23-31. 1991.

LI, C.; JIANG, Z.; JIANG, G.; FANG, J. Seasonal changes of reproductive behavior and fecal steroid concentrations in Pere David's deer. **Hormones and Behavior**, v. 40, p. 518-525, 2001.

LINDSAY, D. R. Reproduction in the sheep and goat. In: CUPPS, P. T. (Ed.). **Reproduction in Domestic Animals**. 4. ed. San Diego: Academy Press, 1991, p. 491-515.

LITWACK, G., SCHMIDT, T. J. Bioquímica de hormônios II: hormônios esteróides. In: DEVLIN, T. M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. São Paulo: Edgard Bliicher, 1998. p. 747-755.

LOSKUTOFF, N. M.; OTT, J. E.; LASLEY, B. L.; Strategies for assessing ovarian function in exotic species. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.14, n.1, p. 3-12, 1983.

LU, Y.; BENTLEY, G. R.; GANN, P. H., HODGES, K. R.; CHATTERTON, R. T. Salivary estradiol and progesterone levels in conception and nonconception cycles in womwn: evaluation of a new assay for salivary estradiol. **Fertility and Sterility**, v. 71, n. 5, p. 863-868, 1999.

LUTSGARTEN, J. A.; WENK, R. E. Simple, rapid, kinetic method for serum creatinine measurement. **Clinical Chemistry**, v. 18, n. 11, p. 1419-1422, 1972.

MACDONALD, I. A.; BOKKENHEUSER, V. D.; WINTER, J.; MCLERNON, A. M.; MOSBACH, E. H. Degradation of steroids in the human gut. **Journal of Lipid Research**, v. 24, p. 675-700, 1983.

MACKIE, W. H. V. Transferencia de embriones en las especies ovina y caprina. In: PALMA, G. A. **Biotecnología de la reproducción**. Balcarce, Argentina: **Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)**, 2001. p. 603-633.

MAIA, M.; COSTA, A. N. Estro e atividade ovariana pós-parto em cabras Canindé, associados ao manejo da amamentação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 22, n. 1, p. 35-43, 1998.

MAUGET, R.; MAUGET, C.; DUBOST, G.; CHARRON, F.; COURCOUL, A.; RODIER, A. Non-invasive assessment of reproductive status in Chinese water deer (*Hydropotes inermis*): correlation with sexual behaviour. **Mammalian Biology**, v. 72, p. 14-26, 2007.

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

MONFORT, S. L.; Non-invasive endocrine measures of reproduction and stress in wild populations. In: W.V. HOLT, PICKARD, A.R., RODGER, J.C., WILDT, D. E. (Ed.). **Reproductive Science and Integrated Conservation**. Cambridge: Cambridge University Press, 2003. p. 147-165.

MONFORT, S. L.; DAHL, K. D.; CZEKALA, N. M.; STEVENS, L.; BUSH, M.; WILDT, D. E. Monitoring ovarian function and pregnancy in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) by evaluating urinary bioactive FSH and steroid metabolites. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 85, p. 203-212, 1989.

MONFORT, S. L.; HARVEY, E.; GEURTS, L.; PADILLA, L., SIMMONS, H. A.; WILLIAMSON, L. R.; WILDT, D. E. Urinary 3 α , 17 β - Androstenediol Glucuronide is a Measure of Androgenic Status in Eld's Deer Stags (*Cervus eldi thamin*). **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 700-706, 1995.

MONFORT, S. L.; WEMMER, C.; KEPLER, T. H.; BUSH, M.; BROWN, J. L.; WILDT, D. E. Monitoring ovarian function and pregnancy in the Eld's deer (*cervus eldi*) by evaluating urinay steroid metabolite excretion. **Journal of reproduction and fertility**, v. 88, p. 271-281, 1990.

MORAIS, R. N. **Fisiologia reprodutiva de pequenos felinos (*Leopardus pardalis*, *Leopardus wiedii* e *Leopardus tigrinus*: sobre a função testicular (gametogênica e esteroiogênica) de machos em cativeiro, incluindo variações sazonais**. 1999. 177f. Tese (doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

MORROW, C. J.; MONFORT, S. L. Ovarian activity in the scimitar-horned oryx (*Oryx dammah*) determined by faecal steroid analysis. **Animal Reproduction Science**, v. 53, p. 191-207, 1998.

MORROW, C. J.; WOLFE, B. A.; ROTH, T. L.; WILDT, D. E.; BUSH, M.; BLUMER, E. S.; ATKINSON, M. W.; MONFORT, S. L. Comparing ovulation synchronization protocols for artificial insemination in the scimitar-horned oryx (*Oryx dammah*). **Animal Reproduction Science**, v. 59, p. 71-86, 2000.

MUNRO, C.; STABENFELDT, G. Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. **The Journal of Endocrinology**, v. 101, n. 1, p. 41-49, 1984.

MUNRO, C. J.; STABENFELDT, G. H.; CRAGUN, J. R.; ADDIEGO, L. A.; OVERSTREET, J. W.; LASLEY, B. L. Relationship of serum estradiol and progesterone concentrations to the excretion profiles of their major urinary metabolites as measured by enzyme immunoassay and radioimmunoassay. **Clinical Chemistry**, v. 37, n. 6, p. 838-844, 1991.

NASCIMENTO, C. C. **Avaliação da função reprodutiva de fêmeas de peixe-boi da Amazônia (*Trichechus iriunguis*, Natterer, 1883), mantidas em cativeiro, por meio da extração e dosagem de esteróides fecais**. 2004. 113 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

NORMAN, A. W.; LITWACK, G. Steroid hormones: chemistry, biosynthesis, and metabolism. In: _____. **Hormones**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1997. p. 49-85.

OLIVEIRA, C. A.; BARNABE, V. H.; FERRARI, S.; ALVARENGA, J. Blood serum and whole milk progesterone levels during the oestrus cycle and early pregnancy in goats. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOATS, 5., 1992, New Dehli. **Proceedings...** New Dehli: International Goat Association, 1992. p. 363.

OSTROWSKI, S.; BLANVILLAIN, C.; MESOCHINA, P.; ISMAIL, K.; SCHWARZENBERGER, F. Monitoring reproductive steroids in feces of Arabian oryx: toward a non-invasive method to predict reproductive status in the wild. **Wildlife Society Bulletin**, v. 33, p. 965-973, 2005.

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

PALME, R.; MÖSTL, E.; BREM, G.; SCHELLANDER, K.; BAMBERG, E. Faecal metabolites of infused ¹⁴C-progesterone in domestic livestock. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 32, p. 199-206, 1997.

PANCIERA, D. L.; PURSWELL, B. J.; KOLSTER, K. A. Effect of short-term hypothyroidism on reproduction in the bitch. **Theriogenology**, v. 68, p. 316-321, 2007.

PATZL, M.; SCHWARZENBERGER, F.; OSMANN, C.; BAMBERG, E.; BATMANN, W. Monitoring ovarian cycle and pregnancy in the giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) by faecal progestagen and oestrogen analysis. **Animal Reproduction Science**, v. 53, p. 209-219, 1998.

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

PEREIRA, R. J. G.; POLEGATO, B. F.; SOUZA, S.; NEGRÃO, J. A.; DUARTE, J.M.B. Monitoring ovarian cycles and pregnancy in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) by measurement of fecal progesterone metabolites, **Theriogenology**, v. 65, p. 387-399, 2006.

PEREZ, C. G.; LAITA, G. B. S.; ILLERA DEL PORTAL, J. C.; LIESA, J. P. Validation of an EIA technique for the determination of salivary cortisol in cattle, **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 2 (1), p. 45-51, 2004.

PETER, A. T.; KAPUSTIN, N.; CRITSER, J. K. Analysis of sex steroid metabolites excreted in the feces and urine of nondomesticated animals. **The Compendium**, v. 18, p. 781-791, 1996.

PICKARD, A.R. Reproductive and welfare monitoring for the management of ex situ populations. In: P. W. V HOLT, A. R., RODGER, J. C., WILDT, D. E. (Ed.). **Reproductive science and integrated conservation**. Cambridge: Cambridge University press, 2003. p. 132-146.

PICKARD, A. R.; ABAIGAR, T.; GREEN, D. I.; HOLT, W. V.; CANO, M. Hormonal characterization of the reproductive cycle and pregnancy in the female Mohor gazelle (*Gazella dama mhorr*). **Reproduction**, v. 122, p. 571-580, 2001.

PINDER, L. Comportamento social e reprodutivo dos veados campeiro e catingueiro. **Anais de Etologia**, v. 10, p. 167-173, 1992.

PIZZUTTO, C.S. **Estudo sobre a influência de técnicas de enriquecimento ambiental nos parâmetros endócrino-comportamentais de antropóides não – humanos mantidos em cativeiro**. 2006. 180f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

PRYCE, C. R.; SCHWARZENBERGER, F.; DOBELI, M. Monitoring fecal samples for estrogen excretion across the ovarian cycle in goeldi's monkey (*Callimico goeldii*). **Zoo Biology**, v. 13, p. 219-230, 1994.

PUKAZHENTHI, B. S.; WILTD, D. E. Which reproductive technologies are most relevant to studying, managing and conserving wildlife?. **Reproduction, Fertility and Development**, v.16, p. 33-46, 2004.

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

RAMSAY, E. C.; MORAN, F.; ROSER, J. F.; LASLEY, B. L. Urinary steroid evaluations to monitor ovarian function in exotic ungulates: pregnancy diagnosis in perissodactyla. **Zoo Biology**, v. 13, p. 129-147, 1994.

REHBINDER, C.; HAU, J. Quantification of cortisol, cortisol immunoreactive metabolites, and immunoglobulin A in serum, saliva, urine, and feces, for noninvasive assessment of stress in reindeer. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 70, p. 151-154, 2006.

ROBINSON, J. J., ASHWORTH, C. J., ROOKE, J. A., MITCHELL, L. M., MCEVOY, T. G. Nutrition and fertility in ruminant livestock. **Animal Feed Science and Technology**, v. 126, p. 259-276, 2006.

ROPSTAD, E. Reproduction in female reindeer. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 561-570, 2000.

ROPSTAD, E.; FORSBERG, M.; KINDAHL, H.; DAHL, E. Aspects of reproduction in female reindeer. **Reproduction Domestic Animal**, v. 31, p. 495-499, 1996.

ROSA, H. J. D.; BRYANT, M. J. Seasonality of reproduction in sheep. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 48, n. 3, p. 155-171, 2003.

ROSENFELD, C. S.; WAGNER, J. S.; ROBERTS, R. M.; LUBAHN, D. B. Intraovarian actions of oestrogen. **Reproduction**, v. 122, p. 215-226, 2001.

SANGHA, G. K.; SHARMA, R. K.; GURAYA, S. S. Biology of corpus luteum in small ruminants. **Small Ruminant Research**, v. 43, p. 53-64, 2002.

SASA, A.; TESTON, D. C.; RODRIGUES, P. A.; COELHO, L. A.; SCHALCH, E. Concentrações plasmáticas de progesterona em borregas lanadas e deslanadas no período de abril a novembro, no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 3, p. 1150-1156, 2002.

SCHEIBE, A. Noninvasive monitoring of reproduction function by determination of faecal progestagens and sexual behaviour in a herd of Przewalski mares in a semireserve. **Acta Theriologica**, v. 44, p. 451-463, 1999.

SCHOENECKER, K. A.; LYDA, R. O.; KIRKPATRICK, J. Comparison of three fecal steroid metabolites for pregnancy detection used with single sampling in bighorn sheep (*Ovis Canadensis*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 40, p. 273-281, 2004.

SCHULTHEISS, O. C.; DARGEL, A.; ROHDE, W. Implicit motives and gonadal steroid hormones: effects of menstrual cycle phase, oral contraceptive use, and relationship status. **Hormones and Behavior**, v. 43, p. 293-301, 2003.

SCHULTHEISS, O. C.; WIRTH, M. M.; STANTON, S. J. Effects of affiliation and power motivation arousal on salivary progesterone and testosterone. **Hormones and Behavior**, v. 46, p. 592-599, 2004.

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

SCHWARZENBERGER, F.; FRANCKE, R.; GOLTENBOTH, R. Concentrations of faecal immunoreactive progestogen metabolites during the oestrus cycle and pregnancy in the black rhinoceros (*Diceros bicornis michaeli*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, p. 285-291, 1993.

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

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

SCHWARZENBERGER, F.; SPECKBACHER, G.; BAMBERG, E. Plasma and fecal progestagen evaluations during and after the breeding season of the female vicuna (*Vicuna vicuna*). **Theriogenology**, v. 43, p. 625-634, 1995.

SCHWARZENBERGER, F.; WALZER, C.; TOMASOVA, K.; VAHALA, J.; MEISTER, J.; GOODROWE, K. L.; ZIMA, J.; LYNCH, M. fecal progesterone metabolite analysis

for non-invasive monitoring of reproductive function in the white rhinoceros (*Ceratotherium simum*). **Animal Reproduction Science**, v. 53, p. 173-190, 1998.

SHAW, H. J.; GREEN, D. I.; SAINSBURY, A. W.; HOLT, W. V. Monitoring ovarian function in Scimitar-horned oryx by measurement of fecal 20 α -progesterone metabolites. **Zoo Biology**, v. 14, p. 239-250, 1995.

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

SINGER, L. A.; KUMAR, M.S. A.; GAVIN, W.; AYRES, S. L.; Predicting the onset of parturition in the goat by determining progesterone levels by enzyme immunoassay. **Small Ruminant Research**, n.52, p. 203-209, 2004.

SONGSASEN, N.; RODDEN, M.; BROWN, J. L.; WILDT, D.E. Patterns of fecal gonadal hormone metabolites in the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). **Theriogenology**, n. 66 (6-7), p. 1743-1750, 2006.

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, p. 125-134, 1999.

TASENDE, C.; FORSBERG, M.; RODRIGUEZ-PIÑON, M.; ACUÑA, S.; GARÓFALO, E. G. Experimentally induced subnormal or normal luteal phases in sheep: reproductive hormone profiles and uterine sex steroid receptor expression. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 17, p. 565-571, 2005

THIMONIER, J. Détermination de l'état physiologique des femelles par analyse des niveaux de progesterone. **INRA Productions Animales**, v. 13, n. 3, p. 177-183, 2000.

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, p. 129-137, 1998.

THOREL, LARSON, S. M. **Radioimmunoassay and related techniques**. Saint Louis: Mosby Company, 1978, 289 p.

TIEFENBACHER, S.; LEE, B.; MEYER, J. S.; SPEALMAN, R. D. Noninvasive technique for the Repeated sampling of salivary free cortisol in Awake, Unrestrained Squirrel Monkeys. **American Journal of Primatology**, v. 60, p. 69-75, 2003

TSUJI, A.; MAEDA, M.; ARAKAWA, H.; Anal. Sciences, 497, 1989

VALARES, J. A.; ABECIA, J.A.; FORCADA, F.; PALACÍN, I.; MATA, L.; RAZQUIN, P. Development of a simple enzyme immunoassay for the determination of ovine luteinizing hormone. **Veterinary Research Communications**, v. 31, p. 427-436, 2007.

VELLOSO, A.; WASSER, S. K.; MONFORT, S. L.; DILTZ, J. M. Longitudinal fecal steroid excretion in maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 112, p. 96-107, 1998.

VERVAECKE, H.; SCHWARZENBERGER, F. Endocrine and behavioral observations during transition of non-breeding into breeding season in female American bison (*Bison bison*). **Theriogenology**, v. 66, p. 1107-1114, 2006.

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

VIÑALES, C.; FORSBERG, M.; RUBIANES, E. Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. **Theriogenology**, v. 55, p. 993-1004, 2001.

WASSER, S. K. Reproductive control in wild baboons measured by fecal steroids. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 393-399, 1996.

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 non domestic mammalian and avian species. **General Comparative Endocrinology**, n. 120, pp. 260-275, 2000.

WASSER, S.K.; MONFORT, S.L.; SOUTHERS, J.; WILDT, D.E. Excretion rates and metabolites of oestradiol and progesterone in baboon (*Papio cynocephalus cynocephalus*) faeces. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 101, p. 213-220, 1994.

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

WASSER, S. K.; VELLOSO, A. L.; RODDEN, M. D. Using fecal steroids to evaluate reproductive function in female maned wolves. **Journal of Wildlife and Management**, v. 59, n. 4, p. 889-894, 1995.

WHEMBOLUA, G. S.; GRANGER, D. A.; SINGER, S.; KIVLIGHAN, K. T.; MARGUIN, J. A. Bacteria in the oral mucosa and its effects on the measurement of cortisol, dehydropiandrosterone and testosterone in saliva. **Hormones and Behavior**, v. 49, p. 478-483, 2006.

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, 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, p. 159-174, 2005.