MONIQUE RODRIGUES CESÁRIO SILVA

**Comparação das concentrações de progesterona sérica e progestinas
fecais em cadelas**

São Paulo

2005

MONIQUE RODRIGUES CESÁRIO SILVA

**Comparação das concentrações de progesterona sérica e
progestinas fecais em cadelas**

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

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Profa. Dra. Valquíria Hyppolito Barnabe

São Paulo

2005

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1554
FMVZ

Silva, Monique Rodrigues Cesário
Comparação das concentrações de progesterona sérica e
progestinas fecais em cadelas / Monique Rodrigues Cesário
Silva. – São Paulo : M. R. C. Silva, 2005.
90 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo.
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento
de Reprodução Animal, 2005.

Programa de Pós-graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.
Orientador: Profa. Dra. Valquíria Hyppolito Barnabe.

1. Cães. 2. Canino. 3. Radioimunoensaio. 4. Hormônios
progestacionais. 5. Endocrinologia. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Assistência Acadêmica

Comissão de Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Comparação das concentrações de progesterona sérica e progestinas fecais em cadelas da raça Boxer", protocolo nº663/2005, utilizando 17 cães, sob a responsabilidade do Prof^a Dr^a Valquiria Hyppolito Barnabe, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Correlation between the serum progesterone and concentration of faecal progestins in Boxer bitches", protocol number 663/2005, utilizing 17 dogs, under the responsibility of Prof^a Dr^a Valquiria Hyppolito Barnabe, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 17 de maio de 2005

Profª Drª Júlia Maria Matêra
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SILVA, Monique Rodrigues Cesário

Título: Comparação das concentrações de progesterona sérica e progestinas fecais em cadelas

Dissertação 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 Mestre em Medicina Veterinária

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof: Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof: Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof: Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Ao **Fernando** e a **Letícia**, que
sempre me ajudaram a realizar
meu sonho, sem reclamar da
minha freqüente ausência.

Aos meus pais e irmãos,
Raimundo, Aurora (in memoriam),
Manoel, Marcos e Junior e
minha tia **Isabel** por me
ensinarem a lutar por meus
objetivos.

"Renda-se como eu me rendi.

*Mergulhe no que você não conhece como
eu mergulhei.*

*Não se preocupe em entender,
viver ultrapassa qualquer entendimento"*

(Clarice Lispector)

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível graças à colaboração direta ou indireta de muitas pessoas. Por isso, manifesto a minha gratidão a todos, e em especial:

À Prof. Dra. **Valquíria Hyppólito Barnabe** por ter me recebido como uma de suas orientadas.

Ao Prof. Dr. **Renato Canpanarut Barnabe** pelo apoio e exemplo de ética e pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira**, obrigado pelo auxílio nas dosagens hormonais e na organização das idéias para o trabalho.

Ao Prof. Dr. **Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães** pela ajuda durante o desenrolar desse Curso.

Ao **Departamento de Reprodução Animal** por ter me recebido e me dado condição de concluir meus experimentos

Ao **Curso de Pós-Graduação do Departamento de Reprodução Animal** em nome do seu coordenador, Prof. Cláudio Alvarenga de Oliveira, pela oportunidade.

À Prof. Dra. **Maria Angélica Miglino** e à Prof. Dra. **Paula de Carvalho Papa** do Departamento de Cirurgia, Programa de Pós Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres – FMVZ – USP.

À **Adriana** pela acolhida sincera e pela ajuda em todos os momentos.

À amiga **Márcia Wilde** por dar suporte em meu trabalho de maneira exemplar.

Aos veterinários e funcionários do Clínica Veterinária, **Ana Paula, Fernanda, Reinaldo, Eduardo, Marcelino, Fabio, Serginho, Alexandre, Sr. Roberto, Eduardo, Luana, João Paulo, Julio, Sergio, Walquiria, Fernando e Luis Otávio** obrigado por ajudarem mantendo as coisas funcionando bem durante minha ausência e ao **Adriano**, especialmente, pela ajuda com as coletas.

As “meninas” **Neguinha, Deby, Taly, Loretta, Hermione, Sessi, Amiga** (*in memoriam*), **Dolce, Tuti, Fanta, Malu, Duilia** (*in memoriam*), **Única, Elohá, Mila, Matilda e Melissa** os meus agradecimentos. A realização deste trabalho só foi possível graças a essas heroínas, que hoje são parte de nossa família.

À **Érica, Priscila, Marie, Lílian, Adriana, Tati** e ao **LDH**, na pessoa do Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira, obrigado pelo auxílio nas dosagens hormonais.

À **Paola, Luciana, Karina e Paulo** em especial pelo companheirismo. Aos amigos da pós, **Marcílio, Thiesa, Everton, Viviane, Tati, Flávia, Lílian, Samuel, Lindsay, Torres**.

Às secretárias **Taís e Alice**, à secretária da Pós Graduação **Harumi**.

Aos funcionários **Miguel** e a **Maria Amélia** pela disponibilidade em todas as fases dessa dissertação.

Aos funcionários **Jocimar, Belau e Ira**.

À Dona **Sílvia** pelo seu eterno sorriso.

Às secretárias da pós **Sandra, Cláudia, Dayse e Joana**.

À **Elza Faquim** da biblioteca pela ajuda com a formatação da tese.

À **Nilza Maria Rabello Marino** responsável pela **Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá – FEG / UNESP**, por permitir que eu a utilizasse semanalmente.

À **Jimmy Adans** pelas aulas de estatísticas dadas, pacientemente, em todas as ocasiões.

À **Royal Canin** pelo patrocínio em ração.

E a todos que colaboram de alguma forma para a realização deste trabalho e que não foram citados, meus sinceros agradecimentos.

SILVA, M. R. C. **Comparação das concentrações de progesterona sérica e progestinas fecais em cadelas.** [The correlation between the serum progesterone and the concentration of faecal progestins in bitches]. 2005. 90 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

Com o objetivo de usar o cão doméstico (*Canis familiaris*) como modelo biológico no monitoramento endocrinológico de populações de canídeos selvagens foram comparadas as concentrações de progesterona sérica com as concentrações dos metabólitos deste hormônio nas fezes dos animais. Foram colhidas amostras diárias de sangue e fezes, durante o proestro e estro, e duas vezes por semana durante o diestro ou gestação, de 17 cadelas da Raça Boxer, com idade entre 2 e 7 anos. Os metabólitos fecais de progesterona, após a extração, e a progesterona sérica foram mensurados por radioimunoensaio (RIE). As correlações encontradas entre a progesterona sérica e seus metabólitos nas fezes foram de $r = 0,26$; $p < 0,05$. Pelo teste de análise de variância verificou-se pequena diferença estatística entre as fases do ciclo estral avaliadas ($p < 0,05$). Os resultados mostraram uma grande variabilidade individual. Existe diferença média estatisticamente significativa entre as fases do ciclo seja em soro quanto no extrato fecal ($p < 0,05$). Existe significativa diferença estatística entre os períodos de estro / diestro e proestro / diestro ($p < 0,05$). Averiguou-se ainda que em todas as fases a concentração média do hormônio nas fezes é sempre maior que a do soro ($p < 0,001$). Há uma grande variabilidade nas informações, principalmente nas fezes, obrigando as coletas a serem seriadas e em grande número. Em avaliações individuais, cinco cadelas obtiveram uma correlação considerada boa ($p \leq 0,05$) ou ótima ($p < 0,001$). A

correlação melhora se for comparada a concentração de Progesterona sérica com a concentração de Progestinas fecais do dia seguinte ($r=0,33$; $p<0,05$).

Palavras-Chave: Cães. Canino. Radioimunoensaio. Hormônios progestacionais. Endocrinologia.

ABSTRACT

SILVA, M. R. C. **Correlation between serum progesterone and concentration of faecal progestins in bitches.** [Comparação das concentrações de progesterona sérica e progestinas fecais em cadelas]. 2005. 90 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

It was studied and analyzed the domestic dog (*Canis familiaris*) as biological model applying an endocrinological monitoring in the wild canines population. The main goal of this work is to compare serum progesterone with metabolics concentration of hormones in animal feces. It was collected blood and feces samples during proestus and estrus period and after that during the diestrus period, twice a week, from 17 boxer bitches, aged between 02 and 07 years old. Progesterone fecal metabolities and serum progesterone were measured by radioimmunoassay (RIA). The correlations that were found between serum progesterone and their metabolities in feces were $r = 0,26$ $p < 0,05$. It was verified a small difference between the estral cycle phases evaluated ($p < 0,05$), by the ANOVA test. The outcomes have presented a great individual variability and an average statistical difference between the phases in the serum and feces stratum ($p < 0,05$). It is important to mention that there is a significant difference between estrus / diestrus and proestrus / diestrus periods ($p < 0,05$). It was noticed that in all the phases the average amount of hormones in feces was always higher than the one that was found in serum ($p < 0,001$). There is a great variability in all the gathered information specially when dealing with feces, establishing a need to prepare several amounts of in-series samples. In individual evaluation, only 05 bitches had the following correlation: good ($p \leq 0,05$) or excellent ($p < 0,001$). The correlation between serum progesterone and

progesterone fecal metabolites improves if we compare it with the concentration of progesterone fecal metabolites measured in the following next day ($r=0,33$; $p<0,05$).

Key words: Dogs. Canine. Radioimmunoassay. Pregnancy hormones.
Endocrinology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Canis onde animais estavam alojados.....	37
Figura 2	- Canil individual para coleta de fezes.....	37
Figura 3	- Lote com 4 fêmeas participantes do experimento.....	38
Figura 4	- Alíquotas de 0,3 g de fezes foram colocadas em tubos de vidro de 10 mL previamente identificados.....	41
Figura 5	- Material após a primeira centrifugação	41
Figura 6	- Secagem no fluxo (Láctea [®]) sob ar comprimido	42
Figura 7	- Após a completa secagem dos extratos, estes foram diluídos em 1,0 mL de metanol (Álcool metílico, Synth [®]) e agitados no aparelho Multi Vortex	42
Figura 8	- Demonstração gráfica da validação do conjunto diagnóstico DPR [®] para quantificação de Progesterona sérica em cadelas. São Paulo, 2005	42
Figura 9	- Gráfico para comparação das médias da concentração sérica de Progesterona e de Progestinas fecais em cada fase do ciclo estral analisada	53
Figura 10	- Gráfico para comparação das médias da concentração sérica de Progesterona e de Progestinas fecais obtidas no dia seguinte ao da amostra sanguínea em cada fase do ciclo estral analisada	55
Figura 11	- Gráfico das médias da concentração sérica de Progesterona e de Progestinas fecais em cada fase do ciclo analisada individualmente	56

Figura 12	-	Gráfico das médias da concentração sérica de Progesterona e de Progestinas fecais do dia seguinte em cada fase do ciclo analisada individualmente	58
Figura 13	-	Perfil de Progesterona sérica e seus metabólitos nas fezes da cadela 17 no período de proestro, estro ($p=0,001$). São Paulo, 2005.	61
Figura 14	-	Perfil de Progesterona sérica e seus metabólitos nas fezes da cadela 12 no período de proestro, estro ($p=0,997$). São Paulo, 2005	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Percentual de reações cruzadas do conjunto comercial de Radioimunoensaio para progesterona da marca DPC® Progesterona Coat a Count DPC®	45
Tabela 2	- Controle de qualidade da técnica de extração Teste de Komolgorov-Smirnov	50
Tabela 3	- ANOVA para valores médios de soro e fezes colhidas no mesmo dia ($p < 0,05$)	52
Tabela 4	- Teste de Tuckey para comparação do valor de p	52
Tabela 5	- ANOVA para valores médios de soro e fezes colhidas no mesmo dia ($p < 0,05$)	52
Tabela 6	- Teste de Tuckey para comparação do valor de p	54
Tabela 7	- ANOVA para valores médios de cada fase ($p < 0,05$)	55
Tabela 8	- ANOVA para Valores médios de soro e fezes colhidas no dia seguinte ($p < 0,05$)	57
Tabela 9	- Teste de correlação ($p < 0,05$) nas diferentes fases do ciclo estral da cadela	58
Tabela 10	- Teste de correlação ($p < 0,05$) nas diferentes fases do ciclo estral da cadela, correlacionando-se Progesterona sérica e Progestinas fecais do dia seguinte	59
Tabela 11	- Teste de correlação ($p < 0,05$) de cada cadela, correlacionando-se Progesterona sérica e Progestinas fecais do dia seguinte	60
Tabela 12	- Teste de correlação ($p < 0,05$) das cadelas 10, 11, 13, 14 e 17 correlacionando-se Progesterona sérica e Progestinas fecais do dia seguinte	61

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	23
3	HIPÓTESE.....	33
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1	OS ANIMAIS.....	36
4.2	COLHEITA DE MATERIAL PARA ANÁLISE.....	38
4.2.1	Sangue.....	38
4.2.2	Fezes.....	39
4.2.3	Processamento da Amostra fecal para análise.....	40
4.2.4	Avaliação da eficiência da Análise.....	43
4.2.5	Validação do Conjunto de Diagnóstico.....	43
4.2.6	Teste de Repetibilidade Intra-ensaio.....	44
4.2.7	Quantificação Hormonal.....	44
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1	RECUPERAÇÃO.....	48
5.2	VALIDAÇÃO.....	48
5.3	TESTE DE REPETIBILIDADE DA TÉCNICA UTILIZADA PARA EXTRAÇÃO HORMONAL.....	49
5.4	PERFIS HORMONAIS.....	51
5.4.1	Comparação entre Concentração Sérica e Fecal.....	51
5.4.2	Comparação entre Concentração Sérica e Fecal do Dia Seguinte.....	53

5.4.3	Comparação entre as Fases do Ciclo Estral.....	55
5.4.4	Comparação entre as Fases do Ciclo Estral: Concentração sérica x Concentração de Progestinas Fecais do dia seguinte.....	57
5.4.5	Coeficiente de Correlação: Concentração sérica x Concentração fecal.....	58
5.4.6	Coeficiente de Correlação: Concentração sérica x Concentração fecal do dia seguinte.....	59
5.4.7	Coeficiente de Correlação: Concentração sérica x Concentração fecal Mensurada individualmente.....	59
6	CONCLUSÕES.....	64
	REFERÊNCIAS.....	66
	APÊNCICES.....	72
	ANEXOS.....	88

1. Introdução

1 INTRODUÇÃO

As técnicas de reprodução assistida têm evoluído de modo a melhorar o desempenho reprodutivo de espécies domésticas e selvagens (HATAMOTO, 2004).

A inseminação artificial tem se tornado uma importante ferramenta no manejo de espécies de cativeiro e o monitoramento dos metabólitos de esteróides fecais tem grande utilidade na avaliação das terapias hormonais empregadas (BROWN et al., 2001). Para viabilizar tal técnica, a concentração de progesterona durante o estro deve ser usada para se definir o momento ideal da cobertura (VAN KLAVEREN et al., 2001), sendo o acasalamento em momento impróprio uma das maiores falhas em programas reprodutivos (GOODMAN, 2001).

Embora diferenças reprodutivas tenham sido demonstradas entre as espécies de uma mesma família, tecnologias que aumentem o sucesso da reprodução assistida no cão doméstico poderão ser utilizadas para canídeos selvagens em vias de extinção (WILDT et al., 1995), além do que, em um curto espaço de tempo, outras espécies que poderão estar sob ameaça de desaparecimento, poderão ser beneficiadas por estas técnicas de reprodução assistida e pelos bancos genômicos (IUCN, 2000).

Os conhecimentos básicos em endocrinologia reprodutiva poderão melhorar as estratégias de manejo das espécies, por isso a grande utilidade de técnicas não invasivas de monitoramento, como a extração para monitoração de hormônios fecais (BROWN et al., 2001).

Os cães domésticos são importantes para o ser humano, por serem não só animais de companhia, mas também por servirem como guia para cegos, auxílio psicológico no tratamento de doenças, por servirem como tração de trenó nas

regiões árticas, pastoreio de rebanhos, caça, guarda, policiamento e para a detecção de drogas em aeroportos (CASE et al., 1995). Nos centros urbanos a população de cães tem aumentado dia a dia, havendo atualmente um cão para cada dez habitantes (REICHMANN et al., 2003).

A raça Boxer ocupa lugar de destaque, estando entre as 17 mais registradas no ano de 2004, segundo o Relatório de Atividades Cinófilas da CBKC (CONFEDERAÇÃO BRASILEIRA DE CINOFILIA, 2004). Classificado como um cão de porte médio, com peso das fêmeas variando de 22 a 35 Kg e altura mínima de 53 cm para as fêmeas, de temperamento dócil e amistoso. A docilidade e o fácil manejo durante as coletas reduzem o stress causado pelos procedimentos.

Para ocorrer o desenvolvimento das técnicas de reprodução assistida é necessário conhecer as particularidades da fisiologia reprodutiva (GURAYA, 1987).

Estratégias de monitoramento endócrino de animais selvagens e / ou de zoológicos precisam ser desenvolvidas para o efetivo monitoramento reprodutivo das espécies. Uma investigação endocrinológica eficiente com fins reprodutivos precisa de repetidas amostras para análises hormonais, o que na maioria das espécies não domésticas não é possível, fazendo com que a análise não invasiva de urina e fezes seja a opção viável. As dificuldades na coleta da urina em animais de vida livre fazem com que as fezes sejam a melhor escolha para a análise do perfil endócrino (SCHWARZENBERGER et al., 1996).

As técnicas de monitoramento não invasivo, na perspectiva conservacionista, poderão ser usadas para incrementar os programas de manejo reprodutivo, assim como o desenvolvimento e a compreensão dos mecanismos fisiológicos que envolvem a reprodução, o convívio social e as pressões ecológicas das espécies estudadas (MONFORT et al., 1997).

Várias espécies têm sido monitoradas através de técnicas não invasivas de quantificação de esteróides fecais. No Brasil espécies como a Onça Pintada (VIAU, 2003), Gato Mourisco (BERBARE, 2004) e Bugio (KUGELMEIER, 2005), entre outros, tem tido resultados satisfatórios, com informações que ajudam a esclarecer pontos importantes do ciclo reprodutivo.

Sendo assim, este estudo tem como objetivo verificar a existência de correlação positiva entre a concentração de progestinas fecais e de progesterona sérica em cadelas da raça Boxer, ambas mensuradas por kits de Radioimunoensaio de fase sólida (DPC Coat – A – Count, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA).

2 REVISÃO DE LITERATURA

O ciclo estral da cadela é dividido em quatro fases distintas: proestro, estro, diestro e anestro (JOHNSTON et al., 2001), apresentando aspectos diferenciados, quando comparado ao ciclo estral dos demais animais domésticos.

A cadela é monoéstrica não-estacional, com intervalo interestro variando de 5 a 12 meses. Os oócitos primários são liberados dos folículos na tuba uterina no início da meiose (FARSTAD, 2000) necessitando maturação nas tubas previamente à fertilização (CONCANNON et al., 1989).

A fase folicular do ciclo é compreendida pelo proestro (CONCANNON et al., 1989), e o período potencialmente fértil, estende-se do final do proestro ao meio do estro (LUZ, 2004).

No proestro ocorre desenvolvimento folicular ovariano, aumento das concentrações plasmáticas de estradiol, atração de machos, edema vulvar e perineal, e secreção vaginal sero-sanguinolenta. Nesta fase a fêmea ainda não é receptiva sexualmente ao macho (CONCANNON et al., 1989). Tem duração de 1 a 2 semanas, com variação de 3 dias a 3 semanas (CONCANNON et al., 1989). Em termos endócrinos, o proestro termina com o pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH). Desta forma, ocorre a transição da fase folicular para fase luteal, e inicia-se o estro (CONCANNON et al., 1977; CONCANNON et al., 1989). O estro é caracterizado pela receptividade sexual e aumento crescente das concentrações plasmáticas de progesterona, com duração média de uma semana, podendo variar de dois dias a 3 semanas (CONCANNON et al., 1989). Na maioria dos ciclos, o pico pré-ovulatório de LH ocorre um dia antes da transição comportamental de proestro a

estro, embora o início do estro e a primeira cobertura possam ocorrer 2-3 dias antes ou até 4-5 dias após o pico de LH (CONCANNON et al., 1989).

Outra particularidade do ciclo da cadela é a ocorrência do fenômeno de luteinização folicular pré-ovulatória (CONCANNON et al., 1977). A fase luteal do ciclo pode ser então compreendida pelo estro (quando ocorre o início da formação do corpo lúteo) e pelo diestro (CONCANNON et al., 1977; CONCANNON et al., 1989).

O diestro corresponde à fase de atividade do corpo lúteo, que se segue ao estro (LUZ, 2004).

O início da formação dos corpos lúteos se dá através da luteinização folicular pré-ovulatória, que se completa após as ovulações, desencadeadas pelo pico pré-ovulatório de LH (LUZ, 2004). A duração varia conforme a classificação utilizada. Pode-se considerar sua duração como sendo "em torno" de 2 meses, assim como na gestação; 2-3 meses em função do desenvolvimento mamário associado com a pseudo-gestação evidente ou não; por volta de 80 dias, ao se considerar o decréscimo da progesterona a valores de 1ng/mL; 100 a 160 dias quando se considera a queda das concentrações de progesterona a valores basais de anestro inferiores a 0,5 ng/mL; ou 120 a 140 dias quando o efeito da progesterona no endométrio já não é mais evidente (CONCANNON; DIGREGORIO, 1986). O anestro é o período de inatividade ovariana, não-estacional, associado a baixas concentrações circulantes de progesterona, estradiol e LH (JEFFCOATE, 1993), e altas concentrações de FSH (hormônio folículo-estimulante) (OLSON et al., 1982). É a fase do ciclo onde ocorre involução uterina, sendo o intervalo entre o final da fase luteal na fêmea não-gestante ou término da gestação e o início do próximo proestro (JEFFCOATE, 1998).

A citologia vaginal esfoliativa é um parâmetro de diagnóstico bastante confiável aos estudos da reprodução em cadelas, em virtude de sua importância no monitoramento reprodutivo dos animais (BENETTI et al., 2004). A técnica é usada em associação à observação dos sinais clínicos, para determinação das fases do ciclo estral, visando a detecção do momento ideal para cópula ou realização da inseminação artificial (BARNABE et al., 1986; VANNUCCHI et al., 1997). O epitélio vaginal é classificado histologicamente como estratificado pavimentoso, sendo particularmente sensível às alterações hormonais, em especial à ação do estrógeno (MIALOT, 1984). A inseminação ou cobertura deve ser realizada quando a fêmea apresentar uma citologia com pelo menos 70% de células epiteliais superficiais (SILVA et al., 2001).

Segundo England et al. (1989), além da morfologia celular observada através da citologia vaginal convencional, o padrão de cristalização do muco vaginal das cadelas em estro deve também ser observado, uma vez que o mesmo apresentaria alterações de acordo com o aparecimento do pico de estrogênio no decorrer do ciclo estral.

As referências bibliográficas diferem sobre a concentração de hormônios no sangue da cadela, o que pode ser explicado pelas diferenças nas amostras investigadas (plasma ou soro), por preparações diferentes (com ou sem separação cromatológica) ou por diferenças nos métodos bioquímicos empregados (radioimunoensaio ou ligação protéica) na mensuração. As variações podem também ser atribuídas a diferenças raciais, ao número de óvulos liberados por animal ou à idade (CHRISTIANSEN, 1984).

Johnston et al. (2001) citam também variações diurnas, principalmente progesterônicas, sendo os níveis detectados em um estudo duas vezes maiores

pela manhã do que os observados à tarde. O método mais eficiente para se determinar a ovulação é através da dosagem de progesterona plasmática, uma vez que a cadela é a única dentre as fêmeas domésticas que apresenta um aumento da progesterona dois a três dias antes da ovulação (JOHNSTON et al., 2001). Os valores de progesterona sérica são inferiores a 1,0 ng/mL durante o anestro e a maior parte do proestro e rapidamente começam a aumentar nas proximidades do pique de LH (CONCANNON et al., 1989).

Johnston et al. (2001) observaram concentrações plasmáticas deste hormônio inferiores a 2ng/ml, 36 a 48 horas antes do parto. Relatam também que os valores progesterônicos podem chegar a 15-90 ng/ml aos 15-30 dias após o pico pré ovulatório de LH e que, posteriormente, são similares para fêmeas prenhes, não prenhes e para cadelas ovariectomizadas.

Segundo Goodman (2001) a cobertura da cadela no momento impróprio é a causa mais comum de falhas em programas de criação, sendo provocado por duas características da reprodução canina: o curto intervalo do período fértil (uma vez o oócito maduro sua fertilização deve ocorrer em 48-72 horas) e a longevidade dos espermatozoides no trato genital da fêmea, o que favorece acasalamentos muito antes da ovulação, mas é um fator limitante se o sêmen é de baixa qualidade ou o número de coberturas é limitado.

A dosagem de Progesterona é hoje uma prática rotineira que pode ser feita com auxílio de kits semiquantitativos comerciais de *Enzyme linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (ENGLAND et al., 1989) ou por laboratórios especializados que fornecem valores quantitativos obtidos por radioimunoensaio (RIE). O RIE é geralmente o mais acurado das duas técnicas, sendo, entretanto, mais caro e requerendo maior tempo de execução (JOHNSTON et al., 2001).

Van Klaveren et al. (2001) compararam os resultados de kits comerciais de ELISA rápido (Progesterone Small Rapid ELISA[®], Status-Por Test[®] e Ovucheck Premate Test[®]) com os resultados obtidos com RIE e concluíram que esses testes são imprecisos para uso clínico na determinação do melhor momento para o acasalamento.

Após a síntese os hormônios esteróides são liberados na corrente sanguínea e, devido a sua baixa solubilidade em água, são transportados por proteínas específicas entre as quais se encontram as globulinas carreadoras ou albuminas. São sintetizados à partir do colesterol e não formam depósito, sendo liberados conforme são produzidos por simples difusão através da membrana celular (CUNNINGHAM, 1992).

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. 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. São então degradados pela microbiota intestinal e parcialmente reabsorvidos ou excretados via fezes de forma não conjugada (CAPEZZUTO, 2004).

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 (CAPEZZUTO, 2004).

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 16 a 24 horas (SCHATZ; PALME, 2001).

A progesterona é produzida pelas células luteínicas do corpo lúteo, pela placenta e pelas glândulas adrenais. É transportada na corrente circulatória por uma proteína de ligação. Sua secreção é estimulada pelo Hormônio Luteinizante (LH). É responsável pela preparação do endométrio para a implantação e manutenção da gestação, aumentando a atividade secretora de glândulas do endométrio e diminuindo a motilidade do miométrio. Atua sinergicamente com os estrógenos na indução do comportamento de cio, auxilia o desenvolvimento do tecido secretor da glândula mamária, desempenhando assim papel fundamental na regulação hormonal do ciclo estral (HAFEZ, 2004).

Ela 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 (BROWN et al., 1994; MACDONALD et al., 1983; SCHWARZERBENGER et al., 1996).

Schatz e Palme, em 2001, confirmaram que a concentração máxima dos esteróides nas fezes acontece após 24 $\pm$ 4 horas da aplicação pela via endovenosa.

Segundo Moorman et al. (2002) a excreção máxima de Progesterona acontece nas fezes, 16 horas após a administração, em primatas, usando-se EIA para a medição da concentração do esteróide no extrato fecal.

Graham et al. (2001) sugerem o uso de imunoensaio enzimático (EIA) para o

monitoramento de progestinas fecais, como uma alternativa mais prática e econômica ao RIE.

O estudo da endocrinologia de forma não invasiva poderá ser usado no monitoramento da função reprodutiva das fêmeas, acasalamentos ou inseminações artificiais (IA) e diagnósticos de gestação, além de que, o conhecimento e a aplicação de técnicas de biotecnologia caminha lado a lado aos programas de conservação de canídeos não domésticos (GOODROWE et al., 2000),

Segundo Brown et al. (2001) a técnica não invasiva de quantificação de metabólitos fecais de hormônios esteróides, é uma das melhores ferramentas disponíveis hoje para a compreensão dos princípios da endocrinologia de espécies de zoológicos.

Na visão conservacionista, as técnicas não invasivas de monitoramento endócrino poderão ser usadas para ampliar os programas reprodutivos das populações de animais cativos, assim como aumentar o entendimento dos mecanismos fisiológicos envolvidos na supressão dos sinais reprodutivos em resposta a pressões sociais e ecológicas (MONFORT et al., 1997).

Hay et al. (2000) compararam a concentração de progestinas sérica e fecal em cadelas, encontrando grande variação individual nas concentrações do extrato fecal, com a correlação entre as duas variando de 0,41 a 0,97 ($p < 0,05$).

Songsasen et al. (2004) trabalharam com Lobos – Guará, fazendo EIA, e encontraram parâmetros hormonais similares ao de outros canídeos e aos resultados encontrados por Velloso et al. (1998) utilizando RIE.

Walker et al. (2002), trabalhando com *Canis rufus*, encontraram uma boa correlação entre as concentrações de esteróides nas fezes e no soro no período periovulatório. Neste experimento, apesar da presença de metabólitos de

Progesterona, a maioria das progestinas fecais se apresentava com metabólitos de pregnane.

Gudermuth et al. (1998) concluiu que a concentração dos esteróides presentes nas fezes reflete a maioria das alterações hormonais do ciclo reprodutivo de cadelas, mas devido a grande variabilidade dos valores, em um mesmo indivíduo e entre eles, amostras seriadas seriam necessárias para detectar as alterações.

A utilização da medição de Progestinas fecais no monitoramento dos ciclos ovarianos seria limitada nesta espécie (GUDERMUTH et al., 1998).

A concentração de Progesterona mensurada pode representar uma pequena parcela do total de progestinas encontradas nas fezes (GUDERMUTH et al., 1998).

A estocagem de amostras de fezes tem sido um ponto crítico para as análises, pois a metabolização dos esteróides fecais pelas bactérias se inicia algumas horas após a deposição (KHAN et al., 2002).

Amostras de fezes liofilizadas de Cheetah estocadas à temperatura ambiente não apresentaram diferença significativa nas concentrações de esteróides quando comparadas aquelas estocadas à – 20° C. As fezes dessecadas ao sol ou em forno apresentaram um aumento significativo na concentração de Progestinas fecais (TERIO et al., 2002).

Trabalhando com fezes de babuínos, Beehner e Whitten (2004) verificaram que, se estocadas à temperatura ambiente, apenas os metabólitos de glucocorticóide sofreram algum tipo de degradação após um período de 40 dias. Quando estocadas a – 10°C não foram observadas diferenças significativas por mais de 400 dias.

Lynch et al. (2003), trabalhando com fezes de babuínos, concluíram que a

melhor alternativa é a liofilização e o armazenamento à – 20º C, já a estocagem em geladeira provocou aumento nas concentrações de esteróides.

Amostras de fezes de rinoceronte dessecadas em forno ou estocadas em 80 MeOH mantiveram as concentrações de estrógenos estáveis por pelo menos 180 dias quando estocadas em temperatura ambiente (WIEKE et al., 2004).

3. Hipótese

3 HIPÓTESE

Existe correlação entre a concentração sérica de progesterona e a concentração de progestinas fecais em cadelas.

4. Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido em canil particular de criação de cães da raça Boxer, localizado na cidade de Guaratinguetá, região do Vale do Paraíba, Estado de São Paulo.

4.1 OS ANIMAIS

Não houve modificação no manejo a que os animais estavam habituados. As baias mediam 1,5 m x 12 m, sendo 4,5 m² de área coberta. O número de animais por canil variou de um a três.

Foram empregadas 17 cadelas da raça Boxer com idade variando de dois a sete anos. Antes do experimento os animais passaram por avaliação clínica geral com exames como hemograma, glicemia, função hepática, função renal, protoparasitológico e pesquisa de hemoparasitas. Foram vermifugados a cada três meses conforme rotina do canil e testados para brucelose previamente ao início do experimento, confirmando que os animais estavam negativos para a doença.

As cadelas receberam ração balanceada comercial¹ uma vez ao dia, às 16:00 horas, sendo dado 800g por animal diariamente. A água fresca era fornecida “ad libitum”.

O peso corpóreo variou entre 25,3 Kg e 32,4 Kg, no início do experimento.

Special Croc® - Royal canin (ANEXO A)

Não houve nenhuma alteração clínica nas cadelas, durante o período das coletas.

Figura 1 – Canis onde animais estavam alojados

Figura 2 – Canil individual para coleta de fezes

Figura 3 – Lote com 4 fêmeas participantes do experimento

4.2 COLHEITA DE MATERIAL PARA ANÁLISE

Foram colhidas amostras de fezes e sangue de todos os animais participantes do experimento.

4.2.1 Sangue

Colheitas de sangue para a avaliação de progesterona sérica foram feitas em tubos de coleta heparinizados, através de punção da veia cefálica, com a retirada de 3 mL de sangue total.

Para determinação das variações deste hormônio foram realizadas coletas diárias, sempre às 10:00 hs, sendo iniciadas a partir dos primeiros sinais clínicos visíveis de estro – edema vulvar e descarga vaginal sanguinolenta. As coletas foram

mantidas diariamente durante toda a fase de proestro e estro, passando a ser feita duas vezes por semana durante o diestro e início da gestação, pois algumas cadelas foram acasaladas.

Imediatamente após a colheita, as amostras de sangue foram centrifugadas a 800g por 10 minutos, para separação do plasma, que foi então acondicionado em tubos “Eppendorf” de 0,5 mL, identificados e armazenados a -20°C , para posterior análise.

Diariamente eram feitos esfregaços vaginais para citologia e detecção da fase do ciclo estral. A técnica utilizada para a coleta foi introduzir um “swab” de Rayon - INLAB[®] na vagina, no sentido crânio dorsal até a porção mais cranial da mesma, de onde foram retiradas as amostras do epitélio. As células foram depositadas sobre uma lâmina para microscopia para, por meio de “Panótico Rápido” - LABORCLIN[®], serem então coradas e avaliadas.

4.2.2 Fezes

As fêmeas em regime de coleta eram mantidas em canis individuais para viabilizar a amostragem de fezes, feita diretamente do chão. O material foi colhido diariamente em material plástico, identificado e armazenado a -20°C , para posterior quantificação de metabólitos fecais do hormônio esteróide (Progesterona).

As dosagens de progesterona sérica e progestinas fecais foram realizadas no Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH) do Departamento de Reprodução

Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (VRA, FMVZ-USP) através de conjuntos diagnósticos comerciais².

4.2.3 Processamento da amostra fecal para análise

A metodologia empregada para extração de Progesterona do material fecal foi realizada de acordo com a técnica descrita por Brown et al. (1994), tendo sofrido algumas modificações.

Alíquotas de 0,3 g de fezes foram colocadas em tubos de vidro de 10 mL previamente identificados. Foram homogeneizados em aparelho Vortex (PHOENIX, MOD AT 56) sendo então fervidas em 5 mL de etanol 90% (90% etanol: água destilada) por 20 minutos a 90°C em banho-maria (Quimis[®]) sob uma capela de fluxo laminar. O volume inicial de etanol a 90% era mantido, evitando a secagem da amostra. Posteriormente, foram centrifugados por 15 minutos a 500g. O sobrenadante foi transferido para tubos limpos. Ao pellet formado foram acrescentados mais 5,0 mL de etanol a 90%, homogeneizado em aparelho Vortex e centrifugado novamente por mais 15 minutos. O sobrenadante da segunda centrifugação foi unido ao primeiro, os quais foram secos no fluxo (Láctea[®]) sob ar comprimido (MSI 5,2 ML/100). Após a completa secagem dos extratos, estes foram diluídos em 1,0 mL de metanol (Álcool metílico, Synth[®]) e agitados no aparelho Multi Vortex (VWR Scientific Products, VX-2500) por 10 minutos. Os extratos diluídos no metanol

² COUT-A-COUNT Progesterone, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA-DPC[®]

foram acondicionados em tubos “Eppendorf” de 1,5 mL e armazenados a -20°C até o momento da quantificação hormonal.

Figuras 4 – Alíquotas de 0,3 g de fezes foram colocadas em tubos de vidro de 10 mL previamente identificados

Figura 5 – Material após a primeira centrifugação

Figura 6 – Secagem no fluxo (Láctea[®]) sob ar comprimido

Figura 7 – Após a completa secagem dos extratos, estes foram diluídos em 1,0 mL de metanol (Álcool metílico, Synth[®]) e agitados no aparelho Multi Vortex

4.2.4 Avaliação da eficiência da análise

As amostras foram diluídas 1:10 em tampão gelatina pH 7,0 [NaP04 (13,8g), NaCl (9,0g), azida sódica (1,0g), gelatina (1,0g) e água destilada (1000 ml)] antes das análises.

A eficiência de extração das progestinas fecais foi avaliada pela adição de 10ng/mL de progesterona, proveniente do padrão do conjunto diagnóstico de radioimunoensaio (GUDERMUTH, 1998), em 5 amostras de fezes, após a primeira extração e quantificação.

Refeita a extração hormonal dessas amostras com 10 ng/mL de progesterona adicionadas, calculou-se a diferença entre a concentração adicionada e a concentração dosada inicialmente.

4.2.5 Validação do Conjunto de Diagnóstico

Foi feita uma curva de paralelismo para validação do kit de diagnóstico de Progesterona.

Foi utilizado um pool de amostras com valores próximos ao limite inferior da curva padrão para comparação com níveis conhecidos do padrão do kit.

O objetivo do teste é verificar se há ou não a interferência da matriz na ligação antígeno – anticorpo.

4.2.6 Teste de Repetibilidade Intra-ensaio

Foi realizada a medição em uma cadela em cada fase do ciclo (proestro, estro e diestro) por 10 vezes consecutivas, utilizando-se a mesma amostra de fezes, para verificar se os valores estavam em uma distribuição normal na curva (controle intra-ensaio).

4.2.7 Quantificação hormonal

As amostras foram dosadas por meio de "Kits" comerciais de radioimunoensaio em fase sólida (COUT-A-COUNT, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA-DPC®), desenvolvidos para avaliação quantitativa de progesterona no soro humano (BROWN et al., 1994). Este conjunto diagnóstico comercial utiliza como elemento traçador ^{125}I .

Todas as amostras foram dosadas uma única vez.

Os percentuais de reações cruzadas do conjunto diagnóstico DPC® para progesterona sérica e seus metabólitos encontram-se descritos na tabela 1.

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

Esteróide	% de Reação Cruzada
Progesterona	100%
Androstenediol	Não detecta
Cortieosterona	0.9%
Cortisol	0.03%
Oanazol	0.006%
11-Deoxyeortieosterona	2.2%
11-Deoxyeortisol	0.01%
DHEA-SO ₄	0.002%
20a- Dihydroprogesterona	0.2%
Estradiol	Não detecta
17a- Hydroxyprogesterona	3.4%
Medroxyprogesterona	0.3%
Pregnane	Não detecta
5β-Pregnane-3a-ol-20- one	0.05%
5α-Pregnane-3,20-dione	9.0%
5β-Pregnane-3,20-dione	3.2%
Pregnenolona	0.1%
5-Pregnane-3β-ol-20- one-sulfato	0.05%
Testosterona	0.1%

As concentrações determinadas primariamente por RIE foram expressas para progesterona em ng/mL.

Para os extratos fecais, foi necessária a conversão para ng/g de fezes úmidas, sendo os resultados obtidos transformados pela seguinte equação:

$$CF = \frac{C \times V_{fe} \times D \times [1 + (1-R)]}{P_i}$$

P_i

Sendo:

CF = concentração final;

C = concentração fornecida pelo RIE;

Vfe = volume das fezes ao final da etapa de extração;

D = diluição empregada;

R = taxa de recuperação obtida;

Pi = peso inicial

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a verificação do paralelismo entre a curva do conjunto diagnóstico empregado e a curva obtida dos extratos fecais foi realizada análise de regressão simples.

Para o Teste de Repetibilidade utilizado na extração hormonal foi feito um Teste de Komolgorov-Smirnov para verificar a aderência dos dados a uma distribuição normal.

Análise de Variância (ANOVA) foi feita para comparação dos dados obtidos no soro sanguíneo e no extrato fecal.

Foi feito Teste para o Coeficiente de Correlação para avaliação da concentração de Progesterona sérica e da concentração de Progestinas fecais do mesmo dia, sendo repetida para a concentração de Progestinas fecais no dia seguinte ao da coleta da amostra de sangue.

5. Resultados e Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos serão apresentados e discutidos em seguida.

5.1 RECUPERAÇÃO

O protocolo utilizado apresentou-se eficiente para a extração das progestinas fecais.

O percentual médio de recuperação nos cinco ensaios de extração utilizados foi de 81,49%. Esse índice é considerado bom, quando comparado ao de outros carnívoros, como os felídeos, onde o percentual de extração para Progesterona foi de 77,18% (BERBARE, 2004).

5.2 VALIDAÇÃO

Foi demonstrado o paralelismo das curvas, sendo $r = 0,965$, significando que não houve interferência da matriz do extrato fecal e que os hormônios presentes estão interagindo com os anticorpos de maneira similar a dos

hormônios usados na curva padrão do kit de diagnóstico usado, usando-se um intervalo de confiança de 95%. A validação do conjunto de diagnóstico de RIE da DPC já foi descrito em outros trabalhos, sendo usado na quantificação de metabólitos fecais em diferentes espécies por Viau (2003), Berbare (2004); Capezutto (2005) e Kugelmeier (2005).

Figura 8 – Demonstração gráfica da validação do conjunto diagnóstico DPR[®] para quantificação de Progesterona sérica em cadelas. São Paulo, 2005

5.3 Teste de Repetibilidade da técnica utilizada para extração hormonal

Foi realizada a medição em uma cadela em cada fase do ciclo (proestro, estro e diestro) por 10 vezes consecutivas, utilizando-se a mesma amostra de fezes (controle intra-ensaio).

Utilizou-se o teste de Komolgorov-Smirnov, com o intuito de verificar se os dados se associam a uma distribuição normal.

Tabela 2 – Controle de qualidade da técnica de extração Teste de Komolgorov-Smirnov

Repetibilidade	Diestro	Proestro	Estro
Média	206,23	34,17	50,24
Mediana	204,33	34,06	52,30
Desvio Padrão	36,44	6,48	11,93
Mínimo	150,17	23,68	26,67
Máximo	278,48	48,33	62,58
Tamanho	10	10	10
Limite Inferior	183,64	30,16	42,85
Limite Superior	228,82	38,18	57,64
<i>p</i>	0,955	0,805	0,963

A variabilidade em cada medida do ciclo é considerada baixa, o que demonstra que existe uma regularidade nas medições. Considerando-se o valor de p , as três distribuições se aproximam a uma distribuição normal (APÊNDICE A).

5.4 Perfis Hormonais

Foram colhidas e analisadas 176 amostras de soro sanguíneo e 158 amostras de fezes de 17 cadelas da raça Boxer, com idades que variavam de 2 a 7 anos, durante os períodos de proestro, estro e diestro.

Serão apresentados os perfis do conjunto de animais nas diferentes fases do ciclo e em seguida de cada animal individualmente.

Será também comparado o resultado da concentração de Progesterona sérica com a de Progestinas fecais do dia seguinte.

5.4.1 Comparação entre Concentração Sérica e Fecal

Serão comparados os valores médios de progesterona entre as fases do ciclo no soro e nas fezes colhidas no mesmo dia, utilizando-se ANOVA.

Tabela 3 – ANOVA para valores médios de soro e fezes colhidas no mesmo dia ($p < 0,05$)

	Soro			Fezes		
	Diestro	Estro	Proestro	Diestro	Estro	Proestro
Média	29,06	10,72	2,36	171,10	116,21	62,77
Mediana	28,78	6,36	0,94	91,61	72,75	36,41
Desvio Padrão	7,36	10,96	2,68	205,71	139,79	58,30
Mínimo	2,59	0,29	0,12	19,01	8,97	6,6
Máximo	40	40	8,56	1179,53	929,93	211,84
Tamanho	71	79	27	56	79	24
Limite Inferior	27,35	8,30	1,36	117,23	85,39	39,44
Limite Superior	30,77	13,13	3,37	224,98	147,04	86,09
p-valor	<0,001			0,015		

Existe diferença média estatisticamente significativa entre as fases do ciclo tanto em soro quanto em fezes.

O quadro abaixo descreve os p -valores dessas comparações:

Tabela 4 – Teste de Tuckey para comparação do valor de p

		Diestro	Estro
Soro	Estro	<0,001	
	Proestro	<0,001	<0,001
Fezes	Estro	0,067	
	Proestro	0,013	0,072

Somente em soro é que existe diferença de diestro para todas as demais fases.

Em fezes, não se pode dizer que exista diferença média estatisticamente significativa entre diestro e estro. Diferença entre diestro e proestro apenas.

Figura 9 – Gráfico para comparação das médias da concentração sérica de Progesterona e de Progestinas fecais em cada fase do ciclo estral analisada

5.4.2 Comparação entre concentração sérica e fecal do dia seguinte

Comparando-se os resultados de Progesterona sérica com os resultados obtidos nos extratos fecais do dia seguinte obtêm-se os seguintes resultados:

Tabela 5 – ANOVA para valores médios de soro e fezes colhidas no mesmo dia ($p < 0,05$)

Dia Seguinte	Soro			Fezes		
	Diestro	Estro	Proestro	Diestro	Estro	Proestro
Média	29,06	10,72	2,36	176,04	103,06	67,46
Mediana	28,78	6,36	0,94	91,11	77,09	37,41
Desvio Padrão	7,36	10,96	2,68	162,23	93,19	71,35
Mínimo	2,59	0,29	0,12	56,9	12,58	17,7
Máximo	40	40	8,56	584,71	385,66	309,24
Tamanho	71	79	27	13	50	17
Limite Inferior	27,35	8,30	1,36	87,85	77,23	33,54
Limite Superior	30,77	13,13	3,37	264,23	128,89	101,38
p-valor	<0,001			0,019		

Tabela 6 – Teste de Tuckey para comparação do valor de p

Fezes do dia Seguinte		Diestro	Estro
Soro	Estro	<0,001	
	Proestro	<0,001	<0,001
Fezes	Estro	0,038	
	Proestro	0,020	0,156

Existe diferença média estatisticamente significativa entre as fases do ciclo tanto na media em soro quanto no extrato fecal.

Pelo quadro de p -valores verifica-se que em soro, todas as fases são estatisticamente diferentes entre si. No entanto em extrato fecal, não existe diferença média estatisticamente significativa entre estro e proestro. Existe diferença estatística significativa entre estro / diestro e proestro / diestro.

Figura 10 – Gráfico para comparação das médias da concentração sérica de Progesterona e de Progestinas fecais obtidas no dia seguinte à amostra sanguínea em cada fase do ciclo estral analisada

5.4.3 Comparação entre as fases do ciclo estral

Fazendo-se a comparação entre soro e fezes do mesmo dia da coleta em cada uma das fases do ciclo obtiveram-se os seguintes resultados:

Tabela 7 – ANOVA para valores médios de cada fase ($p < 0,05$)

	Diestro		Estro		Proestro	
	Soro	Fezes	Soro	Fezes	Soro	Fezes
Média	29,06	171,10	10,72	116,21	2,36	62,77
Mediana	28,78	91,61	6,36	72,75	0,94	36,41
Desvio Padrão	7,36	205,71	10,96	139,79	2,68	58,30
Mínimo	2,59	19,01	0,29	8,97	0,12	6,6
Máximo	40	1179,53	40	929,93	8,56	211,84
Tamanho	71	56	79	79	27	24
Limite Inferior	27,35	117,23	8,30	85,39	1,36	39,44
Limite Superior	30,77	224,98	13,13	147,04	3,37	86,09
p-valor	<0,001		<0,001		<0,001	

Verifica-se que em todas as fases do ciclo, existe diferença média estatisticamente significativa entre o soro e as fezes.

Em todas as fases a média de fezes é sempre maior que a de soro.

Figura 11 – Gráfico das médias da concentração sérica de Progesterona e de Progestinas fecais em cada fase do ciclo analisada individualmente

5.4.4 Comparação entre as fases do ciclo estral: Concentração sérica

X Concentração de Progestinas fecais do dia seguinte

Tabela 8 – ANOVA para valores médios de soro e fezes colhidas no dia seguinte ($p < 0,05$)

Dia Seguinte	Diestro		Estro		Proestro	
	Soro	Fezes	Soro	Fezes	Soro	Fezes
Média	29,06	176,04	10,72	103,06	2,36	67,46
Mediana	28,78	91,11	6,36	77,09	0,94	37,41
Desvio Padrão	7,36	162,23	10,96	93,19	2,68	71,35
Mínimo	2,59	56,9	0,29	12,58	0,12	17,7
Máximo	40	584,71	40	385,66	8,56	309,24
Tamanho	71	13	79	50	27	17
Limite Inferior	27,35	87,85	8,30	77,23	1,36	33,54
Limite Superior	30,77	264,23	13,13	128,89	3,37	101,38
p-valor	<0,001		<0,001		<0,001	

Verifica-se que em todas as fases do ciclo, existe diferença média estatisticamente significativa entre o soro e as fezes.

Em todas as fases a média de fezes é sempre maior que a de soro.

Figura 12 – Gráfico das médias da concentração sérica de Progesterona e de Progestinas fecais do dia seguinte em cada fase do ciclo analisada individualmente

5.4.5 Coeficiente de Correlação: Concentração sérica x Concentração Fecal

Correlação feita de maneira geral e em cada uma das fases do ciclo.

Tabela 9 – Teste de correlação ($p < 0,05$) nas diferentes fases do ciclo estral da cadela. Correlação (r) e nível de significância (p) entre as variáveis-resposta mensuradas.

	Correlação	p-valor
Geral	26,60%	0,002
Diestro	-3,40%	0,881
Estro	27,30%	0,002
Proestro	-26,50%	0,222

As correlações são consideradas baixas.

5.4.6 Coeficiente de Correlação: Concentração sérica x Concentração Fecal no dia seguinte

Correlação para a concentração de Progestinas fecais do dia seguinte.

Tabela 10 – Teste de correlação ($p < 0,05$) nas diferentes fases do ciclo estral da cadela, correlacionando-se Progesterona sérica e Progestinas fecais do dia seguinte. Correlação (r) e nível de significância (p) entre as variáveis resposta mensuradas.

Dia seguinte	Correlação	p-valor
Geral	33,30%	0,005
Diestro	26,30%	0,409
Estro	17,90%	0,256
Proestro	-10,80%	0,679

Ainda assim as correlações são consideradas baixas.

5.4.7 Coeficiente de Correlação: Concentração sérica x Concentração Fecal mensurada individualmente

Na correlação entre soro e fezes, considerando $p < 0,05$, em cada cadela individualmente pode-se verificar quais são as cadelas que não possuem correlação entre fezes e soro.

Tabela 11 –Teste de correlação ($p < 0,05$) de cada cadela, correlacionando-se Progesterona sérica e Progestinas fecais do dia seguinte. Correlação (r) e nível de significância (p) entre as variáveis resposta mensuradas.

Base Completa	Correlação	p-valor
Cadela 1	55,00%	0,125
Cadela 2	53,90%	0,461
Cadela 3	-7,90%	0,921
Cadela 4	-2,90%	0,952
Cadela 5	17,80%	0,775
Cadela 6	-36,40%	0,200
Cadela 7	-34,00%	0,576
Cadela 8	32,40%	0,258
Cadela 9	57,40%	0,051
Cadela 10	82,40%	0,012
Cadela 11	75,00%	0,013
Cadela 12	-0,20%	0,997
Cadela 13	77,40%	0,226
Cadela 14	63,10%	0,068
Cadela 15	12,80%	0,752
Cadela 16	-4,50%	0,924
Cadela 17	93,30%	0,001

Conclui-se que existe correlação considerada boa ou ótima nas cadelas 10, 11, 13, 14 e 17.

No entanto mesmo que se considere somente as cadelas onde se tem correlações boas ou ótimas, ou seja, as cadelas 10, 11, 13, 14 e 17, e calcular a correlação entre soro e fezes, irá se obter uma correlação de 29,1%. Isso acontece porque em cada cadela existe uma alta variabilidade da escala dos dados.

Considerando-se ainda somente estas cadelas, e fazendo-se a correlação para cada uma das fases do ciclo encontradas, tem-se o seguinte resultado:

Tabela 12 –Teste de correlação ($p<0,05$) das cadelas 10, 11, 13, 14 e 17 correlacionando-se Progesterona sérica e Progestinas fecais do dia seguinte. Correlação (r) e nível de significância (p) entre as variáveis resposta mensuradas.

Cadelas 10, 11, 13, 14 e 17	Correlação	p-valor
Todas as fases	29,1%	0,072#
Diestro	41,40%	0,234
Estro	23,10%	0,288
Proestro	29,20%	0,575

Considerando somente as cadelas com boa ou ótima correlação, fazendo-se a correlação por ciclo, encontra-se a melhor correlação em diestro, mas mesmo assim, uma correlação classificada como regular.

Figura 13 – Perfil de Progesterona sérica e seus metabólitos nas fezes da cadela 17 no período de proestro, estro ($p=0,001$). São Paulo, 2005.

Figura 14 – Perfil de Progesterona sérica e seus metabólitos nas fezes da cadela 12 no período de proestro, estro ($p=0,997$). São Paulo, 2005.

Os gráficos de todas as cadelas encontram-se no apêndice B.

As correlações encontradas são consideradas “fracas”, melhorando levemente ao serem comparadas as concentrações de Progesterona sérica do dia seguinte.

Quando aumenta a concentração de Progesterona, a concentração de Progestinas fecais também aumenta, mas mantendo-se a baixa correlação. Provavelmente as progestinas fecais não estão sendo localizadas pelo kit de diagnóstico por causa da alta especificidade da reação antígeno – anticorpo do ensaio DPC Cout – a – Cout para Progesterona, com um baixo índice de reações cruzadas para os metabólitos de Progesterona presentes nas fezes. Muitos desses metabólitos, aparentemente, não estão sendo evidenciados no teste.

Um grupo de 5 cadelas apresentou correlação acima de 50%, chegando uma delas a 93%, o que comprova a alta variabilidade individual.

Outra possível justificativa é que as bactérias presentes nas fezes metabolizam a Progesterona de forma acelerada, formando metabólitos não identificados pelo kit comercial utilizado. A forma de estocagem deve ser avaliada para se verificar a diferença de concentração em fezes frescas, refrigeradas ou congeladas à -20°C .

6. Conclusões

6 CONCLUSÕES

- As concentrações de Progesterona sérica mensuradas foram altamente correlacionadas com a fase do ciclo estral e entre os indivíduos.
- As concentrações de Progestinas fecais mensuradas tiveram, na maioria do grupo avaliado, uma correlação considerada baixa quando comparada a fase do ciclo estral e aos indivíduos, o que comprova a alta variabilidade individual.
- A análise do extrato fecal nos permite identificar as fases “progesterônicas” e “não–progesterônicas” do ciclo estral da cadela, sendo impossível determinar as fases de proestro e estro, uma vez que as duas fases se confundem quando avaliadas através da citologia vaginal.
- O “kit” comercial de radioimunoensaio em fase sólida (COUT-A-COUNT, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA-DPC®), desenvolvido para avaliação quantitativa de progesterona no soro humano não se mostrou como a melhor opção para mensuração da concentração de Progestinas presentes no extrato fecal de cadelas.

Referências

REFERÊNCIAS

BARNABE, V. H.; OLIVEIRA, C. M.; BARNABE, R.C.; VISINTIN, J. A. Citologia vaginal: método auxiliar no diagnóstico de problemas da esfera genital e das fases do ciclo estral na cadela. **A hora Veterinária**, v. 5, n. 29, p. 25-27, 1986.

BEEHNER, J. C.; WHITTEN, P. L. Modifications of a field method for fecal steroid analysis in baboons. **Physiology Behavior**, v.82, p. 269-277, 2004

BENETTI, A. H.; TONIOLO, G. H.; OLIVEIRA, J. A. Concentrações séricas de Progesterona, 17 β -estradiol e cortisol durante o final do proestro, estro e diestro gestacional em cadelas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 2, p. 471-478, 2004.

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.

BROWN, J. L.; GRAHAM, L. H.; WIELEBNOWSKI, N.; SWANSON, W. F.; WILDT, D. E.; HOWARD, J. G. Understanding the basic reproductive biology of wild felids by monitoring of faecal steroids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 57, p. 57-71, 2001.

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 Reproduction**, v. 51, p. 776-786, 1994.

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

CASE, L. P.; CAREY, D. P.; HIRAKAWA, D. A. Performance and stress. In: _____. **Canine and feline nutrition: a resource for companion animal professionals**. St. Louis: Mosby, 1995. p. 243-250.

CHRISTIANSEN, I. J. **Reproduction in the dog and cat**. São Paulo: Bailliere Trindal, 1984. p. 154-170, 1984.

COAT – A – COUNT DPC Progesterone (2003) pág.10

CONCANNON, P. W.; MCCAN, J. P.; TEMPLE, M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. **Journal of reproduction and fertility supplement**, v. 39, p. 3-25, 1989.

CONCANNON, P. W.; TSUTSUI, T.; SHILLE, V. Pregnancy and parturition in the bitch. **Biology of reproduction**, v.16, p. 517-526, 1977.

CONFEDERAÇÃO BRASILEIRA DE CINOFILIA. Relatório de atividade cinófila da CBKC. Disponível: <http://www.cbkc.com.br> > Acesso em 10 jun. 2005.

CUNNINGHAM, J. G. Síntese de hormônios. **Tratado de Fisiologia Veterinária. Rio de Janeiro**: Guanabara Koogan, 1992. p. 261.

ENGLAND, G. C.; ALLEN, W. E.; PORTER, D. J. A Compararison of radioimmunoassay with quantitative and qualitative enzyme-linked immunoassay for plasma progestogen detection in bitches. **Veterinary Records**, v. 125, n. 5, p.107-108, 1989.

FARSTAD, W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 375-387,2000.

GRAHAM, L.; SCHAWARZENBERGER, F.; MÖSTL, E.; GALAMA, W.; SAVAGE, A. A versatile immunoassay for the determination of progestogens in feces and serum. **Zoo Biology**, v. 20, n.1, p. 227-236, 2001.

GOODMAN, M. Ovulation Timing – Concepts and controversies. **Veterinary Clinics of North America – Small Animal Practice** v. 31, n. 2, p. 219, 2001

GOODROWE, K. L.; WALKER, S. L.; RYCKMAN, D. P.; MASTROMONACO, G. F.; HAY, M. A.; BATERMAN, H. L.; WADDELL, W. T. Piecing together the puzzle of carnivore reproduction. **Animal Reproduction Science**, v. 2, n. 60-61, p. 389-403, 2000.

GUDERMUTH, D. F.; CONCANNON, P. W.; DAELS, P. F.; LASLEY, B. L. Pregnancy-specific elevations in fecal concentrations of estradiol, testosterone and progesterone in the domestic dog (*canis familiaris*). **Theriogenology**, v. 50, n. 1, p. 237-248, 1998

GURAYA, S. S. **Biology of spermatogenesis and spermatozoa in mammals**. Berlin Heidelberg: Springer Verlag, 1987. 430 p.

HATAMOTO L. K. **Efeito do estresse e da suplementação com vitamina E sobre parâmetros espermáticos, peroxidação lipídica de componentes seminais e atividade das enzimas antioxidantes presentes no plasma seminal de cães** – 2004. 180 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. Hormônios, fatores de crescimento e Reprodução. **Reprodução Animal**. 7. ed.; São Paulo: Manole, 2004. p. 42.

HAY, M. A.; KING, W. A.; GARTLEY, C. J.; GOODROWE, K. L. Correlation of periovulatory serum and fecal progestins in the domestic dog. **Canine Journal of Veterinary Research**, v. 64, n.1, p. 59-63, 2000.

IUCN. **The 2000 IUNC red list of threatened animals** (In the World Conservations Monitoring Center Animals Database). Cambridge: IUCN Publications service Unit, 2000.

JEFFCOATE, I. A. Endocrinology of anoestrus bitches. **Journal of reproduction and fertility supplement**, v. 47, p. 69-76, 1993.

JEFFCOATE, I. A. Physiology and endocrinology of the bitch. In:____. **Manual of small animal reproduction and neonatology**. Cheltenham: BSAVA, 1998. p.1-9

JOHNSTON, S. D.; KUKUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. N. S. **Canine and feline reproduction**. 1. ed. Philadelphia: Saunders Company, 2001. 592 p.

KHAN, M. Z.; ALTMANN, J.; ISANI, Y. J. A matter of time: evaluating the storage of fecal samples for steroid analysis . **General and Comparative endocrinology**, v. 128, p. 57-64, 2002

KUGELMEIER, T. **Avaliação endocrinológica do ciclo ovariano de macaco bugio (*Alouatta 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.

LUZ, M. R. **Função luteal e luteólise em cadelas: aspectos morfo-funcionais** – 2004. 150 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

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

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

MIALOT, J. P. Patologia da Reprodução dos carnívoros domésticos. **A Hora Veterinária**. v. 434, p. 17-27, 1984.

MONFORT, S. L.; WASSER, S. K.; MASHBURN, K. L.; BURKE, M.; BREWER, B. A.; CREEL, S. R. Steroid metabolism and validation of non invasive

endocrine monitoring in the African Wild dog (*Lycaon pictus*). **Zoo Biology**, v. 16, n. 6, p. 533-548, 1997.

MOORMAN, E. A.; MENDOZA, S. P.; SHIDELER, S. E.; LASLEY, B. L. Excretion and measurement of estradiol and progesterone metabolites in the feces and urine of female squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). **American Journal of Primatology**, v. 57, p. 79-90, 2002.

OLSON, P. N.; BOWEN, R. A.; BEHRENDT, M. D.; OLSON, J. D.; NETT, T. M. Concentrations of reproductive hormones in canine serum throughout late anestrus, proestrus and estrus. **Biology of reproduction**, v. 27, p. 1196-1206, 1982.

PADRÕES OFICIAIS DE RAÇAS CANINAS – CBKC (Confederação Brasileira de Cinofilia) – 2004. Disponível em: <http://www.cbkc.com.br> > acesso em 10 jun. 2005.

REICHMANN, M. L. A. B.; SANDOVAL, M. R. C.; AMADO, M. H. D.; TAKAOKA, N. Y. **Estratégias de controle da raiva canina – experiência do Estado de São Paulo** Disponível em: <http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/informacoes/anais/seminario_internacional/resumo_4_3.htm>. Acesso em: 10 jun. 2005.

SCHATZ, S.; PALME, R. Measurement of faecal cortisol metabolites in cats and dogs: A non-invasive method for evaluating adrenocortical function. **Veterinary Research Communications**, v. 25, n. 4, p. 271-287, 2001.

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

SILVA, L. D. M.; SILVA, R. A.; CARDOSO, R. C. S. Inseminação Artificial em cães. In: GONSALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Varela Editora e Livraria, 2001. cap. 5, p. 69-95.

SILVA, R. A.; CARDOSO, R. C. S.; SILVA, L. D. M. Principais aspectos ligados à aplicação da Inseminação artificial na espécie canina. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 98, p. 53-60, 2003.

SONGSASEN, N.; RODDEN, M.; BROWN, J. L.; WILDT, D. E. Patterns of fecal gonadal hormone metabolites in the maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*). In: **INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CANINE AND FELINE REPRODUCTION**, 5, 2004. São Paulo. p. 123 -124.

TERIO, K. A.; BROWN, J. L.; MORELAND, R.; MUNSON, L. Comparasion of different drying and storage methods on quantifiable concentrations of fecal steroids in the cheetah. **Zoo Biology**, v. 21, p. 215-222, 2002.

VAN KLAVEREN, N. J.; KOOISTRA, H. S.; DIELEMAN, S. J.; VAN LITH, H. A.; SCHAEFERS-OKKENS, A. C. The optimal mating time in the bitch based on the progesterone concentration in peripheral blood. A compaision of reability between three ELISA test kits and 125-iodine radioimmunoassay. **Tijdschr Diergeneeskd**, v. 125, n. 21, p. 680-685, 2001.

VANNUCHI, C. L.; SATZINGER, S.; SANTOS, S. C. Técnica de citologia vaginal como método diagnóstico da fase do ciclo estral em cadelas. Concentrações séricas de Progesterona, 17 β -estradiol e cortisol durante o final do proestro, estro e diestro gestacional em cadelas. **Clínica Veterinária**, v. 2, n. 9, p.14-19, 1997.

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

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

WALKER, S. L.; WADDELL, W. T.; GOODROWE, K. L. Reproductive endocrine patterns in captive female and male red wolves (*Canis rufus*) assessed by fecal and serum hormone analysis. **Zoo Biology**, v. 21, n. 4 p. 321-335, 2002.

WHIEKE, T.; GRAHAM, L. H.; SAVAGE, A. Comparasion of fecal storage methods for steroid analysis in blk rhinoceroses (*Diceros bicornis*). **Zoo Biology**, v. 23, p. 291-300, 2004

WILDT, D.; PUKAZHENTHI, B.; BROWN, J.; MONFORT, S.; HOWARD J. G.; ROTH, T. Spermatology for understanding, managing and conserving rare species. **Reproduction Fertility and Development**, v. 7, n. 4, p. 811-824, 1995.

Apêndices

APÊNDICE A - Teste de Repetibilidade da técnica utilizada para extração hormonal. Os gráficos a seguir comprovam que os valores estão numa distribuição normal na curva.

Histograma - Diestro

DIESTRO

Histograma - Proestro

PROESTRO

Histograma - Estro

APÊNDICE B - Gráficos com o Perfil de Progesterona sérica e seus metabólitos nas fezes ($\pm$ EPM) por cadela

Figura XX – Perfil de Progesterona sérica e seus metabólitos nas fezes da cadela 01 no período de proestro, estro e diestro. São Paulo, 2005.

Figura XX – Perfil da Progesterona sérica e seus metabólitos nas fezes da cadela 02 no período de proestro, estro e diestro. São Paulo, 2005.

Figura XX – Perfil da Progesterona sérica e seus metabólitos nas fezes da cadela 03 no período de proestro, estro e diestro. São Paulo, 2005.

Figura XX – Perfil da Progesterona sérica e seus metabólitos nas fezes da cadela 04 no período de proestro, estro e diestro. São Paulo, 2005.

Figura XX – Perfil da Progesterona sérica e seus metabólitos nas fezes da cadela 05 no período de proestro, estro e diestro. São Paulo, 2005.

Figura XX – Perfil da Progesterona sérica e seus metabólitos nas fezes da cadela 06 no período de proestro, estro e diestro. São Paulo, 2005.

Figura XX – Perfil da Progesterona sérica e seus metabólitos nas fezes da cadela 07 no período de proestro, estro e diestro. São Paulo, 2005.

Figura XX – Perfil da Progesterona sérica e seus metabólitos nas fezes da cadela 08 no período de proestro, estro e diestro. São Paulo, 2005.

Figura XX – Perfil da Progesterona sérica e seus metabólitos nas fezes da cadela 09 no período de proestro, estro e diestro. São Paulo, 2005.

Figura XX – Perfil da Progesterona sérica e seus metabólitos nas fezes da cadela 10 no período de proestro, estro e diestro. São Paulo, 2005.

Figura XX – Perfil da Progesterona sérica e seus metabólitos nas fezes da cadela 11 no período de proestro, estro e diestro. São Paulo, 2005.

Figura XX – Perfil da Progesterona sérica e seus metabólitos nas fezes da cadela 12 no período de proestro, estro e diestro. São Paulo, 2005.

Figura XX – Perfil da Progesterona sérica e seus metabólitos nas fezes da cadela 13 no período de proestro, estro e diestro. São Paulo, 2005.

Figura XX – Perfil da Progesterona sérica e seus metabólitos nas fezes da cadela 14 no período de proestro, estro e diestro. São Paulo, 2005.

Figura XX – Perfil da Progesterona sérica e seus metabólitos nas fezes da cadela 15 no período de proestro, estro e diestro. São Paulo, 2005.

Figura XX – Perfil da Progesterona sérica e seus metabólitos nas fezes da cadela 16 no período de proestro, estro e diestro. São Paulo, 2005.

Figura XX – Perfil da Progesterona sérica e seus metabólitos nas fezes da cadela 17 no período de proestro, estro e diestro. São Paulo, 2005.

APÊNDICE C - Gráfico dispersão para as cadelas com correlação <50% **APÊNDICE D** - Gráfico dispersão para as cadelas com correlação >50%

APÊNDICE E - Gráfico dispersão Planilha - Proestro, Estro e Diestro **APÊNDICE F** - Gráfico dispersão Planilha

APÊNDICE G - Gráfico dispersão Planilha **APÊNDICE H** - Gráfico dispersão Planilha

APÊNDICE I - Dispersão Progestina Fecal do Dia Seguinte **APÊNDICE J** - Dispersão Progestina Fecal do Dia Seguinte

APÊNDICE L - Dispersão Progestina Fecal do Dia Seguinte

Anexos

ANEXO A – Formulação da ração Special Croc, Royal Canin**Composição básica do produto**

Farinha de vísceras, milho integral moído, glúten de milho, farelo de soja, gordura animal estabilizada, polpa cítrica, cloreto de sódio (sal comum), palatilizante, premix vitamínico mineral.

NÍVEIS DE GARANTIA

Umidade (máx.) 10,0%; Proteína Bruta (mín.) 22,0%; Extrato Etéreo (mín.) 8,0%;
Matéria Fibrosa (máx.) 4,0%; Matéria Mineral (máx.) 8,0%; Cálcio (Ca) (máx.)
1,8%; Fósforo (P) (mín.) 0,9%; Energia Metabolizável 3.130 Kcal / Kg.