

PATRÍCIA ESPÍNDOLA BRETAS BERBARE

Avaliação longitudinal das concentrações de esteróides fecais em fêmeas de gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*, Lacépède, 1809)



São Paulo  
2004

PATRÍCIA ESPÍNDOLA BRETAS BERBARE

Avaliação longitudinal das concentrações de esteróides  
fecais em fêmeas de gato-mourisco (*Herpailurus  
yagouaroundi*, Lacépède, 1809)

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

**Departamento:**

Reprodução Animal

**Área de Concentração:**

Reprodução Animal

**Orientador:**

Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz  
Guimarães

São Paulo  
2004

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.1372      Berbare, Patrícia Espíndola Bretas  
FMVZ      Avaliação longitudinal das concentrações de esteróides fecais em fêmeas de gato mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*, Lacépède, 1809) / Patrícia Espíndola Bretas Berbare. – São Paulo : P. E. B. Berbare, 2004.  
111 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2004.  
Programa de Pós-graduação: Reprodução Animal.  
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães.

1. Metabólitos.      2. Esteróides.      3. Ciclo estral animal.  
4. Radioimunoensaio. 5. Felidae. I. Título.



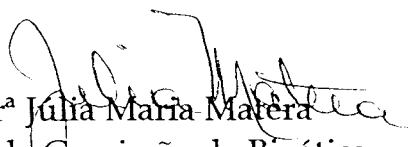
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
*Comissão Bioética*

## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo do ciclo ovariano do gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroïund*) em cativeiro por meio da extração e dosagem de metabólitos de hormônios esteróides sexuais nas fezes", Protocolo nº316/2003, utilizando 8 gatos-mourisco, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 29/10/03.

(We certify that the Research "Monitoring the ovarian cycle of captive jaguarundi (*Herpailurus yagouaroïund*) using fecal sexual hormone metabolites measurements" protocol number 316/2003, utilizing 08 cats, under the responsibility of Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in 10/29/2993, meeting.

São Paulo, 31 de outubro de 2003

  
Prof.ª Dr.ª Júlia Maria Matêra  
Presidente da Comissão de Bioética  
FMVZ/USP

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: BERBARE, Patrícia Espíndola Bretas

Título: Avaliação longitudinal das concentrações de esteróides fecais em fêmeas de gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*, Lacépède, 1809)

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

Data: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

**À minha mãe Regina, *in memoriam*, ao meu pai Sérgio  
à minha avó Carmen pela formação individual,  
carinho, confiança e dedicação.**

**Ao meu marido André pelo amor, inspiração e incentivo.**

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães** pela amizade, incentivo para que eu ingressasse nesta área e pela confiança depositada.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - **FAPESP** pelo suporte financeiro, através da concessão de bolsa de mestrado e auxílio à pesquisa, que viabilizou a execução deste projeto.

À Fundação Parque Zoológico de São Paulo, especialmente ao Diretor Científico **José Catão Dias** e a Chefe do Setor de Mamíferos **Kátia Cassaro**, pela utilização dos animais e atenção conferida ao longo do desenvolvimento do trabalho.

Ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – **IBAMA** por ter concedido a licença para o desenvolvimento do projeto.

Ao **Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira** pela utilização do Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH) – Departamento de Reprodução Animal - FMVZ/USP na extração e quantificação das amostras e pelas discussões ao longo do desenvolvimento do trabalho.

À amiga e técnica do LDH, **Érika Cristiane Gutierrez Felipe** pelo apoio e realização dos ensaios hormonais.

Aos tratadores **Fernando Nery de Castro** e **Dirson Mendes da Silva**, funcionários da Fundação Parque Zoológico de São Paulo, pela paciência e atenção durante as colheitas.

À amiga e veterinária da Fundação Parque Zoológico de São Paulo, **Sandra Helena Ramiro Corrêa** pelo carinho e amizade ao longo desses anos e pela ajuda nas contenções dos animais e nas colheitas.

Ao amigo e **Prof. Dr. Mário Binelli** por ter cedido material para a execução da recuperação hormonal, uso do Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular (LFEM) - Departamento de Reprodução Animal - FMVZ/USP no piloto do projeto e pelas conversas repletas de conhecimento que contribuíram para o amadurecimento do trabalho.

Ao **Prof. Dr. Fábio Bessa Lima** e à técnica **Sandra** pela utilização do contador beta do Laboratório de Fisiologia do Tecido Adiposo - Departamento de Fisiologia e Biofísica - ICB/USP durante os ensaios de recuperação hormonal.

Ao **Prof. Dr. Gilberto Vieira** do laboratório Fleury por ter fornecido o estradiol triciado.

À veterinária **Geórgia Bignardi Jarreta** por tão gentilmente ter realizado exame ultrassonográfico nas fêmeas deste experimento.

À amiga **Priscila Viau** pelo apoio e orientação técnica durante a execução do projeto, por ter ajudado nos pilotos, pela nova amizade conquistada e pelas vastas discussões sobre a nossa profissão.

À amiga **Flávia Miranda** pela prontidão em ajudar e aos amigos **Rogério Zacariotti, Marie Cheline e Vinícius Seixas** pela amizade e incentivo.

Ao biólogo **Peter Crawshaw** cujo trabalho exemplar foi o estímulo inicial na minha decisão de estudar os felídeos selvagens.

Aos técnicos que atuam na área de Animais Selvagens: **Patrícia Helena de Almeida, Aduino Nunes, Rodrigo Teixeira, José Maurício Barbanti, João Paulo Boccia, Oneida Lacerda, Luiz Roberto Francisco, Jean Carlos Ramos Silva e Daniel Fedullo** que em algum momento ao longo da minha formação profissional me deram oportunidades, contribuíram ou serviram de incentivo para que eu me dedicasse a esta área.

A todos os colegas, professores e funcionários do **Departamento de Reprodução Animal** que de alguma maneira contribuíram na execução do trabalho.

Aos amigos que participaram e participam da minha formação profissional e pessoal: **Karina Yazbek, Maria Fernanda Define, Sandra Kitamura, Andreza Ávila, Elizabeth Braga, Tatiana Marrocco, Juliana Marigo e Marcelo Golovaty** pela amizade e carinho.

À **Deus**, por ter chegado até aqui.



*“Não se contente em trilhar um caminho estabelecido.  
Ao contrário, vá para onde não há caminho algum e  
deixe seu rastro”.*

MURIEL STRODE

## RESUMO

BERBARE, P. E. B. **Avaliação longitudinal das concentrações de esteróides fecais em fêmeas de gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*, Lacépède, 1809).** [Longitudinal profiles of fecal steroids concentrations in jaguarundi's females (*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.

O trabalho teve por objetivo estudar o ciclo ovariano de fêmeas de gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*), mantidas em cativeiro, utilizando técnicas de extração e quantificação de metabólitos fecais de hormônios esteróides sexuais e corticosterona. A mensuração dos metabólitos fecais de estradiol, progesterona e cortisol foi efetuada por meio da técnica de radioimunoensaio (RIE). Foram utilizadas oito exemplares fêmeas, mantidas na Fundação Parque Zoológico de São Paulo, São Paulo. As colheitas foram realizadas cinco vezes por semana durante o período de nove meses. As amostras foram acondicionadas individualmente em sacos plásticos e mantidas em freezer a - 20°C. A mediana da duração do ciclo estral (n=33) de gato-mourisco, definido por dois picos consecutivos de metabólitos fecais de estradiol, encontrada no presente estudo, foi de 24 dias; e a duração média±EPM do estro (n=41) foi de 8,65±0,38 dias. O valor da mediana dos valores basais para os metabólitos de estradiol foi de 4,67ng/g de fezes, e dos valores de pico 87,32ng/g de fezes. Para as progestinas os valores encontrados para mediana foram de 0,75ug/g de fezes e 7,49ug/g de fezes para valores basais e de pico respectivamente. As variações no perfil de progestinas sugeriram não terem ocorrido ovulações espontâneas. Não foi encontrada correlação entre progestinas e corticosterona durante os períodos de gestação, lactação e após a retirada dos filhotes.

Palavras-chave: Metabólitos. Esteróides. Ciclo estral animal. Radioimunoensaio. Felidae.

## ABSTRACT

BERBARE, P. E. B. **Longitudinal profiles of fecal steroids concentrations in jaguarundi's females (*Herpailurus yagouaroundi*, Lacépède, 1809).** [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.

The aim of this study was analyze the ovarian cycle of captive jaguarundi (*Herpailurus yagouaroundi*) trough fecal steroid. Radioimmunoassay (RIA) was used for the measurement of estradiol, progesterone and cortisol metabolites in feces. Fecal samples were collected five days per week from eight females kept at Fundação Parque Zoológico de São Paulo during nine months. These samples were placed into zip-lock bags and stored in freezer at - 20°C. The median of estrous cycle length, defined by two consecutive peaks of fecal estradiol metabolites, found in this study was 24 days (n=33 cycles) and the mean ( $\pm$ SEM) of estrous duration was 8,65 $\pm$ 0,38 days (n= 41 cycles). The median concentrations of fecal estradiol metabolites were 4,67ng/g of feces and 87,32ng/g of feces for basal and peak values respectively. Progestins median found was 0,75ug/g of feces for basal and 7,49ug/g of feces for peak values. The fluctuations in progestins profiles suggested that spontaneous ovulation did not occur. No correlations were found between progestins and fecal corticosterone during pregnancy, lactation and kitten removal.

Key words: Metabolites. Steroids. Animal estrous cycle. Radioimmunoassay. Felidae.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - População de gato-mourisco ( <i>Herpailurus yagouaroundi</i> ) em cativeiro no Brasil. Fonte: Censo da Sociedade de Zoológicos do Brasil (SZB).....	20
Figura 2 - População de gato-mourisco ( <i>Herpailurus yagouaroundi</i> ) em cativeiro na Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP). Fonte: censo da Sociedade de Zoológicos do Brasil (SZB) e dados da fundação (anos de 2002 e 2003).....	20
Figura 3 - Demonstração gráfica da validação do conjunto diagnóstico DPC para quantificação de metabólitos de estradiol em extratos fecais de fêmeas de gato-mourisco ( <i>Herpailurus yagouaroundi</i> ).São Paulo, 2004.....	48
Figura 4 - Demonstração gráfica da validação do conjunto diagnóstico DPC para quantificação de metabólitos de progesterona em extratos fecais de fêmeas gato- mourisco ( <i>Herpailurus yagouaroundi</i> ).São Paulo, 2004.....	48
Figura 5 - Perfil dos metabólitos de estradiol e progestinas fecais da fêmea G1 de gato-mourisco, ( <i>Herpailurus yagouaroundi</i> ) durante nove meses de colheita. São Paulo, 2004.....	53
Figura 6 - Perfil dos metabólitos de estradiol e progestinas fecais da fêmea G2 de gato-mourisco, ( <i>Herpailurus yagouaroundi</i> ) durante 9 meses de colheita. Parto indicado pela seta preta. São Paulo, 2004.....	53
Figura 7 - Perfil dos metabólitos de estradiol e progestinas fecais da fêmea G3 de gato-mourisco ( <i>Herpailurus yagouaroundi</i> ) durante 9 meses de colheita. São Paulo, 2004.....	53
Figura 8 - Perfil dos metabólitos de estradiol e progestinas fecais da fêmea G4 de gato-mourisco ( <i>Herpailurus yagouaroundi</i> ) durante 9 meses de colheita. São Paulo, 2004.....	54
Figura 9 - Perfil dos metabólitos de estradiol e progestinas fecais da fêmea G5 de gato-mourisco ( <i>Herpailurus yagouaroundi</i> ) durante 9 meses de colheita. A seta preta indica o parto. NC indica que não houve colheita no referido período.Cada seta vermelha indica a retirada de um filhote.São Paulo, 2004...	56
Figura 10 - Perfil dos metabólitos de estradiol e progestinas fecais da fêmea G6 de gato-mourisco ( <i>Herpailurus yagouaroundi</i> ) durante 9 meses de colheita. A seta preta indica o parto. NC indica que não houve colheita no referido período.Cada seta vermelha indica a retirada de um filhote. São Paulo, 2004.....	58
Figura 11 - Perfil dos metabólitos de estradiol e progestinas fecais da fêmea G7 de gato-mourisco ( <i>Herpailurus yagouaroundi</i> ) durante 9 meses de colheita. São Paulo, 2004.....	59

Figura 12 - Perfil dos metabólitos de estradiol e progestinas fecais da fêmea G8 de gato-mourisco ( <i>Herpailurus yagouaroundi</i> ) durante 9 meses de colheita. São Paulo, 2004.....	60
Figura 13 - Histograma da frequência de duração de ciclos com curva de normalidade de fêmeas de gato-mourisco ( <i>Herpailurus yagouaroundi</i> ). São Paulo, 2004.....	61
Figura 14 - Histograma da frequência de duração de estros com curva de normalidade de fêmeas de gato-mourisco ( <i>Herpailurus yagouaroundi</i> ). São Paulo, 2004.....	61
Figura 15 - Distribuição dos estros de gato-mourisco ( <i>Herpailurus yagouaroundi</i> ) ao longo dos meses do ano, durante o presente estudo. São Paulo, 2004.....	64
Figura 16 - Médias mensais de precipitação e umidade relativa do ar no ano de 2003, durante o período de colheita das amostras do presente estudo. Fonte: São Paulo, IAG-USP, 2004.....	65
Figura 17 - Médias mensais de radiação e insolação no ano de 2003, durante o período de colheita das amostras do presente estudo. Fonte: São Paulo, IAG-USP, 2004.....	65
Figura 18 - Médias mensais de temperatura e temperaturas máximas e mínimas no ano de 2003, durante o período de colheita das amostras do presente estudo. Fonte: São Paulo, IAG-USP, 2004.....	66
Figura 19 - Perfil de corticosterona fecal da fêmea G2 de gato-mourisco ( <i>Herpailurus yagouaroundi</i> ) durante a gestação e lactação. São Paulo, 2004.....	68
Figura 20 - Perfil de corticosterona e progestinas fecais da fêmea G2 de gato-mourisco ( <i>Herpailurus yagouaroundi</i> ) durante a gestação e lactação. A seta preta indica o parto. São Paulo, 2004.....	69
Figura 21 - Perfil de corticosterona fecal da fêmea G5 de gato-mourisco ( <i>Herpailurus yagouaroundi</i> ) durante a gestação, lactação e após a retirada dos filhotes. A seta preta indica o parto. NC indica que não houve colheita no referido período. Cada seta larga (azul) indica a retirada de um filhote. São Paulo, 2004.....	70
Figura 22 - Perfil de corticosterona e progestinas fecais da fêmea G5 de gato-mourisco ( <i>Herpailurus yagouaroundi</i> ) durante a gestação, lactação e após a retirada dos filhotes. A seta preta indica o parto. NC indica que não houve colheita no referido período. Cada seta larga (azul) indica a retirada de um filhote. São Paulo, 2004.....	71
Figura 23 - Perfil de corticosterona fecal da fêmea G6 de gato-mourisco ( <i>Herpailurus yagouaroundi</i> ) durante a lactação e após a retirada dos filhotes. A seta preta indica o parto. NC indica que não houve colheita no referido período. Cada seta azul indica a retirada de um filhote. São Paulo, 2004.....	72
Figura 24 - Perfil de corticosterona e progestinas fecais da fêmea G6 de gato-mourisco	

(*Herpailurus yagouaroundi*) durante a lactação e após a retirada dos filhotes. A seta preta indica o parto. NC indica que não houve colheita no referido período. Cada seta azul indica a retirada de um filhote. São Paulo, 2004..... 73

- Figura 25 - Distribuição geográfica do gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*): 1- *H. y. armeghinoi*; 2- *H. y. cacomitli*; 3- *H. y. eyra*; 4- *H. y. fossata*; 5- *H. y. melantho*; 6- *H. y. panamensis*; 7- *H. y. tolteca* e 8- *H. y. yagouaroundi* (OLIVEIRA, 1998)..... 106
- Figura 26 - Perfis de metabólitos de estradiol e de fêmeas de gato-mourisco obtidos a partir da utilização de amostras liofilizadas e amostras úmidas..... 108
- Figura 27 - Perfis de progestinas de fêmeas de gato-mourisco obtidos a partir da utilização de amostras liofilizadas e amostras úmidas, São Paulo, 2004..... 109

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Porcentual de reações cruzadas dos conjuntos comerciais para Radioimunoensaio para Progesterona e Estradiol da marca DPC e para corticosterona da marca ICN.....	40
Tabela 2 -	Número de amostras colhidas por fêmea de gato-mourisco ( <i>Herpailurus yagouaroundi</i> ) durante os 9 meses de estudo longitudinal. São Paulo, 2004.....	50
Tabela 3 -	Medianas das concentrações de metabólitos de estradiol e progestinas fecais da Fêmea G2 de gato-mourisco ( <i>Herpailurus yagouaroundi</i> ) durante a gestação e a lactação. São Paulo, 2004.....	52
Tabela 4 -	Concentrações médias±EPM de metabólitos de estradiol e progestinas fecais da fêmea G2 de gato-mourisco ( <i>Herpailurus yagouaroundi</i> ) durante as fases da gestação. São Paulo, 2004.....	52
Tabela 5 -	Mediana das concentrações de metabólitos de estradiol e progestinas fecais da fêmea G5 de gato-mourisco ( <i>Herpailurus yagouaroundi</i> ) durante a gestação, lactação e após a retirada dos filhotes. São Paulo, 2004.....	55
Tabela 6 -	Concentrações médias±EPM de metabólitos de estradiol e progestinas fecais da fêmea G5 de gato-mourisco ( <i>Herpailurus yagouaroundi</i> ) durante as fases da gestação. São Paulo, 2004.....	55
Tabela 7 -	Concentrações médias±EPM de metabólitos de estradiol e progestinas fecais da fêmea G6 de gato-mourisco ( <i>Herpailurus yagouaroundi</i> ) durante a gestação, lactação e após a retirada dos filhotes. São Paulo, 2004.....	57
Tabela 8 -	Concentrações mínimas, máximas, basais e de pico para metabólitos de estradiol fecais, encontradas para cada fêmea de gato-mourisco ( <i>Herpailurus yagouaroundi</i> ) durante 9 meses de colheita. São Paulo, 2004.....	62
Tabela 9 -	Concentrações mínimas, máximas, basais e de pico para progestinas fecais, encontradas para cada fêmea de gato-mourisco ( <i>Herpailurus yagouaroundi</i> ) durante 9 meses de colheita. São Paulo, 2004.....	62
Tabela 10 -	Concentrações médias±EPM dos valores basais e de pico dos metabólitos de estradiol e progestinas fecais de cada fêmea de gato-mourisco ( <i>Herpailurus yagouaroundi</i> ) durante 9 meses de colheita. São Paulo, 2004.....	63
Tabela 11 -	Mediana, concentrações máximas e mínimas para valores basais e de pico encontrados para fêmeas de gato-mourisco ( <i>Herpailurus yagouaroundi</i> ) no presente estudo. São Paulo, 2004.....	63

Tabela 12 - Dados meteorológicos (médias mensais e temperatura máxima e mínima) do período de colheita do presente estudo. Fonte: São Paulo, IAG-USP, 2004.....	64
Tabela 13 - Mediana das concentrações de metabólitos de estradiol e progestinas fecais das fêmeas de gato-mourisco ( <i>Herpailurus yagouaroundi</i> ) em conjunto, durante a gestação, lactação e após a retirada dos filhotes. São Paulo, 2004.....	67
Tabela 14 - Concentrações médias±EPM de metabólitos de estradiol e progestinas fecais das fêmeas de gato-mourisco ( <i>Herpailurus yagouaroundi</i> ) em conjunto durante as fases da gestação. São Paulo, 2004.....	67
Tabela 15 - Mediana das concentrações, valores mínimos e valores máximos de corticosterona fecal da fêmea G2 de gato-mourisco ( <i>Herpailurus yagouaroundi</i> ) na gestação e lactação. São Paulo, 2004.....	68
Tabela 16 - Mediana das concentrações, valores mínimos e máximos de corticosterona fecal da fêmea G5 de gato-mourisco ( <i>Herpailurus yagouaroundi</i> ) na gestação, lactação e após a retirada dos filhotes. São Paulo, 2004.....	70
Tabela 17 - Mediana das concentrações, valores mínimos e máximos de corticosterona fecal da fêmea G6 de gato-mourisco ( <i>Herpailurus yagouaroundi</i> ) na gestação, lactação e após a retirada dos filhotes. São Paulo, 2004.....	73



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	23
<b>2.1</b>	<b>A família Felidae</b> .....	24
<b>2.2</b>	<b>A espécie em estudo</b> .....	26
<b>2.3</b>	<b>Estudos reprodutivos em felídeos</b> .....	28
<b>2.4</b>	<b>Monitoramento não invasivo</b> .....	29
<b>2.5</b>	<b>Monitoramento de hormônios glicocorticóides e estresse</b> .....	31
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	33
<b>3.1</b>	<b>Materiais</b> .....	34
<b>3.2</b>	<b>Metodologia</b> .....	36
3.2.1	Extração Hormonal.....	37
3.2.2	Percentual de recuperação.....	38
3.2.3	Quantificação hormonal.....	39
3.2.4	Validação dos conjuntos diagnósticos-Paralelismo.....	41
3.2.5	Ciclos ovarianos.....	42
3.2.6	Avaliação das concentrações fecais de Corticosterona.....	43
3.2.7	Análise Estatística.....	44
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	46
<b>4.1</b>	<b>Recuperação</b> .....	47
<b>4.2</b>	<b>Validação dos conjuntos diagnósticos</b> .....	47
<b>4.3</b>	<b>Controle de qualidade do radioimunoensaio</b> .....	49
<b>4.4</b>	<b>Perfis hormonais de progestinas e metabólitos de estradiol</b> .....	49
<b>4.5</b>	<b>Corticosterona</b> .....	67
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	74

<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>89</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>91</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>105</b>

## Introdução





## 1 INTRODUÇÃO

Os carnívoros, por ocuparem o topo da cadeia alimentar exercem um controle importante sobre a população de suas presas, e conseqüentemente sobre o equilíbrio dos ecossistemas que habitam.

A destruição do habitat natural, a caça e o comércio dos animais e seus subprodutos vem causando um impacto grande nas populações de vida livre. Em cativeiro, o baixo sucesso reprodutivo e a consangüinidade dificultam a manutenção de populações geneticamente viáveis.

Existem 37 espécies que compõem a família Felidae, sendo que o gato doméstico (*Felis catus*), é a única que não apresenta nenhum grau de ameaça de extinção. Compartilharam um ancestral comum há 10-15 milhões de anos atrás (COLLIER; O'BRIEN, 1985) e estão distribuídos por todos os continentes exceto na Austrália, Antártica, algumas ilhas da Oceania e a ilha de Madagascar (OLIVEIRA, 1994).

Dentre as oito espécies de pequenos felídeos neotropicais, temos o gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*), cuja distribuição abrange desde o sul do Texas até as províncias de Buenos Aires e Rio Negro (aproximadamente 39° S) na Argentina, e todo o Brasil com exceção do sul do Rio Grande do Sul (OLIVEIRA; CASSARO, 1997).

Segundo dados obtidos no censo da Sociedade de Zoológicos do Brasil (SZB) a população em cativeiro no país se manteve estável nos últimos anos. Esta estabilidade é proporcionada pelo equilíbrio entre entradas (nascimentos e animais incorporados) e saídas (óbitos). Considerando os dados do censo, a contribuição dos nascimentos e incorporados é praticamente a mesma. Na Fundação Parque Zoológico de São Paulo, local onde foram realizadas as colheitas deste trabalho, a situação de estabilidade nos últimos anos é

semelhante, mas em relação a entrada de animais a participação dos nascimentos é mais importante (figura 2). Nascimentos estes que acontecem ao longo de todo o ano e em número expressivo se comparado ao de outras instituições no país.

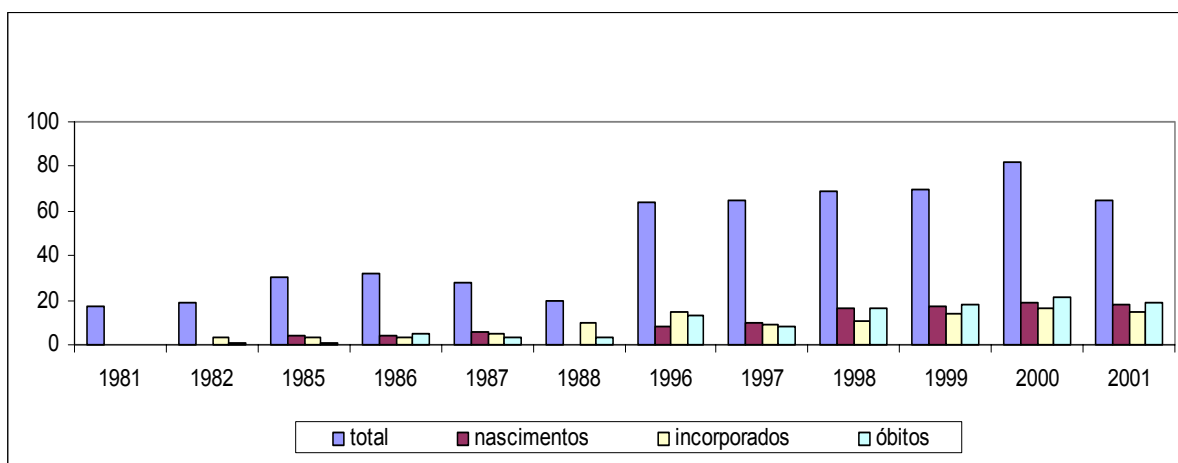


Figura 1 - População de gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*) em cativeiro no Brasil  
Fonte: Censo da Sociedade de Zoológicos do Brasil (SZB)

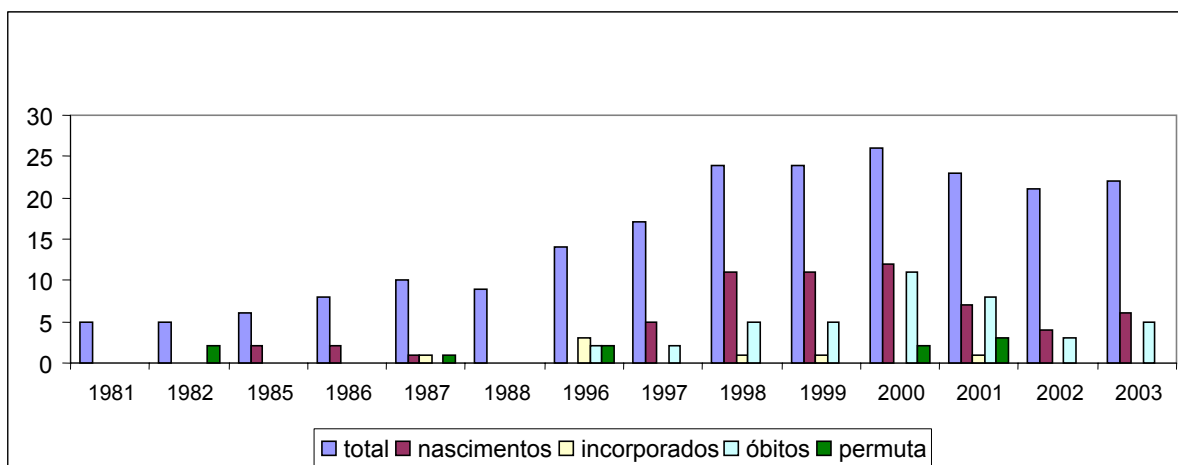


Figura 2 - População de gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*) em cativeiro na Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP)  
Fonte: Censo da Sociedade de Zoológicos do Brasil (SZB) e dados da fundação (anos de 2002 e 2003)

Quanto à população de vida livre, a real situação da espécie no Brasil ainda não é totalmente definida, pois os estudos ainda são escassos e com a progressiva destruição de seu



habitat natural é provável que já esteja ameaçado de extinção em algumas regiões do país. Mas, até o presente momento não é considerada ameaçada de extinção pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Pelo Conservation International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna (CITES) o gato-mourisco está listado no apêndice I nas Américas do Norte e Central desde 1987 e no apêndice II na América do Sul. Não está listado pela International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN), tendo sua classificação global como categoria 5c e 5 (a mais baixa prioridade) regionalmente.

Os estudos reprodutivos em espécies ameaçadas são de grande valia, pois geram conhecimentos que poderão ser aplicados em programas de reprodução natural e assistida, com o intuito de maximizar a reprodução e manter a população estável e geneticamente viável. As técnicas não invasivas para estudos reprodutivos em espécies selvagens têm sido preconizadas pelo fato de reduzir ou, até mesmo eliminar, as interferências com a rotina do manejo de animais adaptados ao cativeiro, evitando-se dessa forma as alterações decorrentes do estresse. Essas técnicas consistem basicamente na extração de hormônios ou de seus metabólitos, de matrizes biológicas, principalmente fezes e urina, e vem sendo amplamente utilizadas em diversas espécies (BAMBERG et al., 1991; LASLEY; KIRKPATRICK, 1991; SCHWARZENBERGER et al., 1996), inclusive em felídeos, permitindo avaliação de função ovariana, diagnóstico de gestação (BROWN et al., 2001; BROWN; WILDT, 1997), função testicular (MORATO, 2001) e monitoramento da resposta da glândula adrenal em situações de estresse, dada a grande participação dos hormônios glicocorticóides neste fenômeno (MÖSTL; PALME, 2002; STILWELL; BROWN; GRAHAM, 1996).

A utilização do monitoramento hormonal permite analisar o ciclo ovariano e suas fases de forma mais precisa. No entanto, o método tradicionalmente utilizado para esse tipo de estudo envolve colheitas seriadas de amostras de sangue, o que representa uma dificuldade



extrema nos estudos com espécies silvestres uma vez que se tornam necessárias contenções físicas e químicas freqüentes, ocasionando estresse severo ao animal. A condição de estresse pode levar a alterações dos resultados obtidos pela ação das concentrações elevadas de cortisol plasmático sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (DOBSON; SMITH, 1995). Esta condição também pode comprometer a saúde do animal ao induzir uma imunodeficiência e propiciar o surgimento de infecções por agentes oportunistas (BREAZILE, 1987; RILEY, 1981). Além disso, já foi descrita a interferência que algumas drogas anestésicas podem exercer, mesmo que temporariamente, na secreção hormonal (CLARK; DOUGHTON, 1983) e na ovulação (HOWARD et al., 1992).

Os dados em literatura sobre o ciclo reprodutivo do gato-mourisco são escassos e baseados apenas em observações comportamentais (HULLEY, 1976; MELLEN, 1993). Assim, mesmo apresentando esta estabilidade na população em cativeiro e não sendo uma espécie considerada ameaçada, informações sobre a fisiologia reprodutiva desta espécie são de extrema importância não apenas pelo conhecimento gerado, mas também pela utilização futura destas informações em programas de reprodução assistida. A validação desta técnica também se faz importante para a sua utilização no monitoramento de animais de vida livre.

Portanto, o presente estudo teve como objetivo estudar o ciclo ovariano desta espécie, utilizando a metodologia de extração e quantificação de metabólitos de estradiol e progestinas fecais, além de avaliar o perfil fecal do hormônio corticosterona em fêmeas em fase de gestação, lactação e após a retirada dos filhotes, momentos considerados potencialmente estressantes.





## Revisão de Literatura





## 2 REVISÃO DE LITERATURA

A seguir serão abordados em separado cada aspecto da revisão de literatura, visando facilitar a leitura.

### 2.1 A família Felidae

A família Felidae pertence a sub ordem Feliformia, Ordem Carnívora, Classe Mammalia, Filo Chordata, Reino Animalia.

Possui representantes em todo o mundo com exceção na Antártica, Austrália, ilha de Madagascar e algumas ilhas da Oceania. Originou-se da família Miacidae que populou a América do Norte e a Eurásia no período Eocênico, há 65 milhões de anos (BADINO, 1975; WALKER; NOWAK, 1968).

Compreende 37 espécies, sendo 36 selvagens. Wozencraft (1993), considera que estas estão agrupadas em três subfamílias: Acinonychinae com o gênero *Acinonyx*; Felinae com os gêneros *Caracal*, *Catopuma*, *Felis*, *Herpailurus*, *Leopardus*, *Leptailurus*, *Lynx*, *Oncifelis*, *Oreailurus*, *Otocolobus*, *Prionailurus*, *Profelis* e *Puma*; e Pantherinae com os gêneros *Neofelis*, *Panthera*, *Pardofelis* e *Uncia*. No entanto, estudos de genética molecular, envolvendo técnicas, como eletroforese bidimensional e tridimensional de proteínas, fixação do microcomplemento, hibridização de DNA-DNA e sequenciamento direto do DNA vêm mostrando novas relações filogenéticas importantes, evidenciando três radiações primárias dentro dos felídeos: linhagem da jaguatirica, linhagem do gato-doméstico e linhagem



pantherine (O'BRIEN et al., 1996). Baseado nestes estudos, os gêneros *Leopardus*, *Oncifelis* e *Oreailurus* pertencem a linhagem da jaguatirica (6 espécies); os gêneros *Felis* e *Otocolobus* a linhagem do gato-doméstico (7 espécies) e os gêneros *Acinonyx*, *Panthera*, *Neofelis*, *Pardofelis*, *Lynx*, *Caracal*, *Leptailurus*, *Profelis* (inclui o antigo *Catopuma*), *Prionailurus*, *Mayailurus*, *Ictailurus*, *Herpailurus* e *Puma* constituem a linhagem pantherine (21 espécies). Estes e novos estudos vão permitir uma classificação taxonômica mais precisa das espécies, deixando para trás diversos esquemas, que se baseavam em características morfológicas e fisiológicas e em dados de etologia

São animais predominantemente solitários e noturnos (WALKER; NOWAK, 1968). São carnívoros estritos, por isso essencialmente predadores e assim sua alimentação baseia-se somente na ingestão de tecidos de origem animal (ALLEN et al., 1996).

Existem 10 espécies de felinos neotropicais: gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus* - Schreber, 1775), gato-maracajá (*Leopardus wiedii* - Schinz, 1821), gato-do-mato-grande (*Oncifelis geoffroyi* - D'orbigny e Gervais, 1844), gato-palheiro (*Oncifelis colocolo* - Molina, 1782), gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi* - Lacépède, 1809), jaguatirica (*Leopardus pardalis* - Linnaeus, 1758), puma (*Puma concolor* - Linnaeus, 1771), onça (*Panthera onca* - Linnaeus, 1758), gato-andino (*Oreailurus jacobitus* - Cornalia, 1865) e kodkod (*Oncifelis guigna* - Molina, 1782) (WOZENCRAFT, 1993). Destes, apenas os dois últimos não são encontrados em território brasileiro.

Os felinos neotropicais são em geral solitários, e interagem entre si apenas para se reproduzir ou quando ainda são muito jovens. Com exceção do gato mourisco, que tem hábitos diurnos, os felinos neotropicais são noturnos. Suas presas são mortas por asfixia ou por mordedura na região da nuca (OLIVEIRA, 1994).



## 2.2 A espécie em estudo

O gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*) é uma das oito espécies de pequenos felídeos neotropicais, cuja distribuição abrange desde o sul do Texas até as províncias de Buenos Aires e Rio Negro (aproximadamente 39° S) na Argentina, e por todo o Brasil com exceção do sul do Rio Grande do Sul (OLIVEIRA; CASSARO, 1997). Ocupa um habitat extremamente variado, incluindo florestas tropicais e subtropicais, cerrados, caatinga, pantanal e vegetações secundárias (BISBAL, 1989; GUGGISBERG, 1975; MONDOLFI, 1986).

O nome *Herpailurus* deriva do Latim “herpa”, que significa estranho e do Grego “ilurus” que significa gato. Já *yagouaroundi* é derivado da palavra Guarani “yaguarundi”, usada para identificar este gato (AZARA, 1802 apud OLIVEIRA, 1998, p. 4). A palavra “yagua” se refere a todos os animais que se alimentam de carne e “rundi” é provavelmente derivado de “irundi” que significa o número 4 ou de “hung’î,” que significa o amarronzado (TIBIRIÇÁ, 1989).

Baseado na distância imunológica da albumina, é colocado na linhagem Pantherinae, que surgiu de 4 a 6 milhões de anos atrás (COLLIER; O’BRIEN, 1985), e dentro desta linhagem, no grupo Puma, juntamente com o guepardo (*Acinonyx jubatus*), com base em estudos de DNA mitocondrial (JOHNSON; O’BRIEN, 1997). Apresenta 38 cromossomos, como os demais felídeos, enquanto que os pequenos felídeos neotropicais possuem apenas 36 (OLIVEIRA, 1994).

Tem membros curtos, a cabeça proporcionalmente pequena em relação ao corpo alongado, orelhas pequenas e cauda longa. Sua pelagem é uniforme, podendo ocorrer em três padrões de coloração: preto-amarronzada, cinza e o vermelho-amarelado. Geralmente as colorações mais escuras são encontradas em regiões de florestas úmidas, enquanto que as



colorações mais claras ocorrem em ambientes mais secos (EMMONS, 1990). Estas características lhe conferem a aparência similar à de um mustelídeo.

Seu comprimento total varia de 93 a 120cm e seu peso, quando adulto de 2 a 9 kg (MONDOLFI, 1986). Tem hábitos solitários e terrestres, mas diferem das outras espécies de felídeos no que tange ao período do dia de maior atividade. São preferencialmente diurnos apresentando picos de atividade entre as 14:00 e 16:00 horas, com queda considerável após às 18:00 horas (KONECNY, 1989).

Em vida livre sua alimentação constitui-se basicamente de pequenos roedores, aves e répteis. No entanto já foram encontrados peixes (MANZANI; MONTEIRO FILHO, 1989) e um sagui-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*) (XIMENEZ, 1982) em conteúdo estomacal de indivíduos desta espécie. Em cativeiro, diversos ítems são oferecidos, dentre os mais comuns temos o pescoço de frango, a carne bovina, pintainhos e camundongos. Quando comparado a adultos de outras espécies de felídeos, o gato-mourisco apresenta um variado repertório de vocalizações com 13 distintos ruídos (HULLEY, 1976).

O ciclo estral tem duração de 53,63 dias (MELLEN, 1993), sendo 3,17 dias o período do estro. A maturidade sexual é alcançada entre 2 e 3 anos de idade (HULLEY, 1976), no entanto Mellen (1993) verificou que em fêmeas ocorre com 1,6 anos. Há uma discordância no que diz respeito ao período reprodutivo. De acordo com Ewer (1973) e Grzimek (1975) não há estacionalidade reprodutiva nos trópicos. Por outro lado, Guggisberg (1975) menciona duas estações reprodutivas no México. A gestação dura de 70 a 75 dias (HULLEY, 1976), após os quais, nascem em média 1,83 filhotes (MELLEN, 1993). Entre 21 e 30 dias a fêmea dá pequenas porções de alimento e com 42 dias os filhotes já são aptos a se alimentarem sozinhos (HULLEY, 1976). Durante o período de receptividade a fêmea rola sobre o próprio dorso e deposita urina em vários pontos, enquanto emite sons semelhantes a um choro. Durante a cópula a fêmea vocaliza e o macho a imobiliza, mordendo o seu pescoço



(HULLEY, 1976). É uma espécie solitária (GUGGISBERG, 1975), no entanto há relato de pares (CABRERA; YEPPE, 1960) e grupos (NOVAES<sup>1</sup>, 2003, informação verbal).

Os dados sobre área de uso no Sudeste do Brasil, obtidos por radiotelemetria, consideram 17,6 Km<sup>2</sup> para um macho observado e 6,8 Km<sup>2</sup> para uma fêmea observada (CRAWSHAW, 1995).

Existem 8 sub-espécies reconhecidas (CABRERA, 1957; HALL, 1981): *H. y. armeghinoi*, que ocorre no oeste da Argentina; *H. y. cacomitli*, que ocorre no sudeste do Texas e México, *H. y. eyra*, Brasil, Paraguai e Argentina; *H. y. fossata*, México e Honduras; *H. y. melantho*, Peru e Brasil; *H. y. panamensis*, Nicarágua até o Equador ; *H. y. tolteca*, México e *H. y. yagouaroundi* nas Guianas e Amazônia (mapa em Anexo A).

A pele do gato-mourisco não tem valor comercial, logo este não é um motivo para caça, mas sim a atividade de predação realizada por esta espécie em propriedades rurais.

### 2.3 Estudos reprodutivos em felídeos

Estudos sistemáticos de fisiologia reprodutiva em felídeos começaram nos anos 70, utilizando o gato doméstico mantido em condições de laboratório (GOODROWE et al., 1989; WILDT, 1991).

Nos anos 80 a utilização de algumas espécies de felídeos selvagens mantidos em cativeiro possibilitou estudos de caracterização seminal (WILDT et al., 1987), descrições da atividade ovariana via laparoscopia, após tratamento com gonadotrofinas exógenas (WILDT et al., 1979) e aplicação de técnicas de reprodução assistida, como inseminação artificial (DRESSER et al., 1982) e transferência de embriões (POPE et al., 1989). A utilização de eCG



e hCG em conjunto, em doses e horários de aplicação variados, tem se mostrado efetiva para o desenvolvimento folicular em várias espécies de felídeos selvagens: puma (*Puma concolor*) (BONNEY, et al., 1981), tigre (*Panthera tigris*) (DONOGHUE et al., 1990) guepardo (*Acinonyx jubatus*) (BROWN et al., 1995, 1996; HOWARD, et al., 1992), gato-leopardo (*Felis Bengalensis*) (BROWN et al., 1994), leopardo das neves (*Panthera uncia*) (BROWN et al., 1994), leopardo nebuloso (*Neofelis nebulosa*) (BROWN et al., 1995), jaguatirica (*Leopardus pardalis*) (SWANSON et al., 1996) e em gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*) (POPE et al., 1998). Esta indução é fundamental em trabalhos de reprodução assistida, no entanto, deve-se atentar que existem relatos de que estas gonadotrofinas podem comprometer o transporte na tuba uterina, a fertilização e a implantação de embriões (GRAHAM et al., 1996, 2000) e induzir reação imunológica, com diminuição da resposta ovariana ao longo do tempo (SWANSON et al., 1995, 1996). Assim estudos recentes vêm testando a utilização da associação de FSH e LH, que até o presente momento não apresentou os efeitos deletérios encontrados com o uso de eCG e hCG (CRICHTON et al., 2003). A pesquisa em biotecnologia vem crescendo rapidamente nestas espécies dada a importância desta ferramenta na conservação (SILVA; MORATO; SILVA, 2004).

#### 2.4 Monitoramento não invasivo

Utilizadas em diversas espécies, as técnicas não invasivas consistem na extração de substâncias de secreções naturais. Há relatos da utilização desta ferramenta para a quantificação hormonal em saliva: cães (KOBELT et al., 2003), primatas (LUTZ et al., 2000), suínos (MENDEL; ZANELLA; BROOM, 1992), humanos (CELEC et al., 2003; HALLIGAN





et al., 2004); leite: bovinos (VERKERK, et al., 1998); fezes: humanos (ADLERKREUTZ; MARTIN, 1976 apud SCHWARZENBERGER et al., 1996, p. 516), primatas (GUIMARÃES, 1999; MATSUMORO et al., 1999; RIBEIRO, 1994; WASSER et al., 1988, 1991), canídeos (GROSS; THARNISH; RODDEN, 1991; GUDERMUTH et al., 1998; SANDS et al., 2004; VELOSO et al., 1998; WASSER et al., 1995), eqüídeos (PALME et al., 1994; SAFAR-HERMANN et al., 1987; SCHWARZENBERGER et al., 1991), cervídeos (PEREIRA, 2001), elefante (WASSER et al., 1996), roedores (MEIRELLES, 1993) e aves (GOYAMANN; MOSTL; GWINNER, 2002); suor: humanos e ovelhas (COOK, 2002); pêlo: procavídeos (KOREN et al., 2002); e em urina: primatas (FRENCH; STRIBLEY, 1985; HEISTERMANN et al., 1987; ZIEGLER et al., 1989), elefante (FIEB et al., 1999) e rinoceronte (KASMAN et al., 1986), em estudos de função ovariana, testicular e adrenal; ritmo de liberação hormonal; monitoramento de estresse e de hierarquia em espécies gregárias.

Quanto aos felídeos, estudos sobre o metabolismo do estradiol em gatos domésticos demonstraram que mais de 95% deste é excretado nas fezes (SHILLE et al., 1984, 1990). Nos felinos selvagens, os metabólitos de estradiol e progestinas estão presentes nas fezes em quantidades significativas (BROWN et al., 1993; CZEKALA et al., 1991). Desta maneira, essa metodologia vem sendo amplamente utilizada para monitorar a função ovariana de felídeos selvagens em cativeiro (BROWN et al., 1994, 1996, 2001; GRAHAM et al., 1995; MORAIS et al., 1996; MOREIRA et al., 2001; VIAU, 2003) e assim extrair informações sobre as fases do ciclo, existência de sazonalidade, tipo de ovulação, além de averiguar a resposta a protocolos de inseminação artificial e superovulação (BROWN; WILDT, 1997).



## 2.5 Monitoramento de hormônios glicocorticóides e estresse

As ferramentas não invasivas devem ser utilizadas na avaliação do estresse uma vez que a contenção por si só pode ser um agente estressor e confundir a interpretação dos resultados (HOPSTER et al., 1999). Os hormônios glicocorticóides estão envolvidos nesta resposta e sua mensuração nas fezes pode ser utilizada para monitorar a atividade adrenal (MÖSTL; PALME, 2002). Em um estudo sobre o metabolismo do cortisol em gatos domésticos demonstrou-se que 85,9% dos metabólitos são excretado nas fezes (GRAHAM; BROWN,1996). Neste mesmo estudo verificou-se que estes metabólitos podem ser mensurados por radioimunoensaio, utilizando-se um conjunto diagnóstico comercial para corticosterona. Este mesmo conjunto foi validado posteriormente para felídeos selvagens (STILWELL; BROWN; GRAHAM,1996) e vem sendo utilizado por outros pesquisadores (MORAIS et al., 1997; MOREIRA, 2001). Vale destacar que a utilização de ensaios hormonais para mensuração de cortisol fecal (JURKE, et al., 1997) e cortisol urinário (CARLSTEAD; BROWN; SEIDENSTICKER, 1993), também se mostraram eficientes na avaliação do estresse em felídeos.

Encontram-se em literatura relatos de que situações estressantes levem a um aumento rápido e expressivo de progesterona sérica. Asher et al. (1989) verificaram que após administração de ACTH em cervo dama (*Dama dama*) houve um aumento expressivo na concentração sérica de progesterona tanto em fêmeas inteiras, como em fêmeas ovariectomizadas. Bertschinger et al. (2002) observaram que em fêmeas de leão (*Panthera leo*) com implante contraceptivo ocorria um aumento na progesterona sérica após a contenção. Anselmo-franci<sup>2</sup>, (2003, informação verbal) também constatou o aumento deste hormônio após situação de estresse em ratas castradas. Ficou evidenciado nestes trabalhos a participação

da glândula adrenal na síntese de progesterona após situações estressantes. Esse aumento sérico provavelmente seria constatado posteriormente nas fezes. Isso é importante pois o monitoramento das progestinas fecais podem nos fornecer não apenas dados de ciclo reprodutivo (origem ovariana), mas também de condições de estresse (origem adrenal).



## **Materiais e Métodos**





### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir serão descritos os materiais e a metodologia empregada neste trabalho.

#### 3.1 Materiais

Foram utilizadas no estudo 8 fêmeas de gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*), com idade variando de 11 meses à 10 anos, sendo consideradas 7 adultas e 1 jovem, que encontravam-se alojadas na Fundação Parque Zoológico de São Paulo (altitude de 800m, latitude 23°39'S e longitude 46°37'W), no bairro da Água Funda em São Paulo, fora do setor de exposição. Estavam submetidas a fotoperíodo natural, e havia contato visual e olfativo com machos da espécie.

Como a proposta do projeto foi a utilização de técnica não invasiva para o monitoramento reprodutivo das fêmeas em questão, ficou estabelecido que durante o período de colheita estas não fossem contidas física e/ou quimicamente. Foram realizadas duas contenções pelo corpo técnico da instituição mantenedora, uma no início do experimento (06 e 07 de fevereiro de 2003) e outra no final (07 e 14 de outubro) para realização de uma avaliação clínica e reprodutiva. A fêmea G6 23120 não foi contida na primeira ocasião uma vez que pariu no dia 14/01/2003, e uma contenção poderia ser prejudicial aos filhotes. Para tanto as fêmeas foram contidas fisicamente com puçá, transferidas para caixas e contidas quimicamente com a associação cloridrato de cetamina (10mg/Kg, Vetaset, Fort Dodge do



Brasil, São Paulo) e cloridrato de xilazina (1mg/Kg, Rompum, Bayer do Brasil, São Paulo) administrada por via intramuscular.

A avaliação clínica consistiu em exame físico, exame de ultra-som abdominal e colheita de sangue para avaliação das funções renal e hepática, pesquisa de hemoparasitas e hemograma. Os animais encontravam-se em estado de higidez nos dois momentos avaliados.

A avaliação reprodutiva consistiu em exame externo da genitália, colheita de material para citologia vaginal, exame de ultra-som (LOGIG  $\alpha$  100 GE, transdutor linear de 7,5 megahertz) do aparelho reprodutivo e quantificação hormonal sérica de estrógeno e progesterona. As fêmeas encontravam-se sem alterações patológicas no sistema reprodutivo nas duas avaliações, sendo que na primeira contenção pôde-se constatar que as fêmeas G2 20762 e G5 25244 estavam prenhes com tempo de gestação estimado pelo exame ultrassonográfico entre 40 e 45 dias e fase final ( $\pm$ 60 dias), respectivamente. O animal G5 25244 pariu 2 filhotes no dia 25/02/03 e o animal G2 20762 pariu 1 filhote em 16/03/03.

Ao longo do trabalho também foram realizados exames coproparasitológicos e quando o resultado foi positivo, os animais receberam o tratamento adequado e a data da administração do medicamento anotada, para que depois fossem verificadas as condições das amostras de fezes subseqüentes ao tratamento.

No quadro 1 encontram-se os dados de cada animal.

Viveiro	Cadastro	Idade	Procedência	Histórico Reprodutivo
G1	26005	1,5 anos	Ilha Solteira-SP	-
G2	20762	10 anos	FPZSP-SP	7 gestações
G3	21566	8 anos	Limeira-SP	7 gestações
G4	27156	11 meses	FPZSP-SP	-
G5	25244	2 anos	FPZSP-SP	2 gestações
G6	23120	6 anos	FPZSP-SP	2 gestações
G7	24142	4 anos	Ribeirão Preto-SP	4 gestações
G8	23851	4,5 anos	FPZSP-SP	2 gestações

FPZSP= Fundação Parque Zoológico de São Paulo

Quadro 1 - Identificação, idade, procedência e histórico reprodutivo das fêmeas de gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*) utilizadas no presente estudo.



Os animais são mantidos pareados em casais na instituição. Para a realização do projeto foi necessário separá-los para que a colheita das fezes fosse individualizada. Para tanto foram realizadas adequações nos viveiros com verba da reserva técnica do auxílio à pesquisa FAPESP n° 02/00990-6, a fim de permitir essa separação. Os animais permaneceram alojados em viveiros de ferro telado (2,0 x 3,0 x 2,0m), cujas medidas respeitam o tamanho mínimo sugerido pela Associação Americana de Zoológicos e Aquários (AZA), exceto o animal G8 que ficou alojado em um viveiro menor.

Os animais receberam diariamente, no período da tarde, dieta elaborada pelo Setor de Nutrição da Fundação Parque Zoológico de São Paulo, constituída por pintainhos, coração e músculo bovino, sendo que nas terças e quintas-feiras recebiam apenas pintainhos. Os animais não foram submetidos a jejum semanal.

### 3.2 Metodologia

A colheita do material foi realizada cinco vezes por semana durante um período total de 9 meses.(14/01/2003 a 03/10/2003). No período da manhã, entre 7:00h e 8:00h, foram colhidas amostras fecais recentes com o auxílio de espátula de madeira e acondicionadas individualmente em sacos plásticos do tipo *zip-lock* que foram identificados quanto ao cadastro do animal, número do viveiro e data. Foram transportadas para a Universidade de São Paulo em isopor com gelo biológico, onde ficaram armazenadas em freezer a -20°C até o processamento.





### 3.2.1 Extração Hormonal

As fezes armazenadas foram processadas de acordo com a técnica descrita por Brown et al. (1994), exceto pela utilização de fezes úmidas ao invés de liofilizadas. Essa alteração foi definida após a realização de um piloto (Anexo B).

Foram adicionados 5ml de etanol (MERCK®) a 90% (90% etanol: 10% água destilada) à uma alíquota de 0,2g da amostra úmida em tubo de ensaio de vidro com capacidade para 15ml. Após homogeneização em aparelho vortex (PHOENIX, MOD AT 56) por 1 minuto, as amostras foram fervidas em banho-maria (FANEM) por 20 minutos à 80°C. Durante este tempo o etanol evaporado foi gradativamente repostado para que nenhuma amostra ficasse seca, de forma que ao final desta etapa o volume inicial fosse mantido. Foram então centrifugadas (FANEM) por 15 minutos a 500g e o sobrenadante recuperado. O sedimento foi ressuspensionado em 5 ml de etanol 90%, homogeneizado em aparelho vortex por 1 minuto e recentrifugado. Os dois sobrenadantes foram combinados e secos completamente em banho-maria acoplado a um fluxo de ar comprimido (LÁCTEA). Os tubos secos, de cada ensaio de extração, foram então vedados com parafilme, mantidos em freezer a -20°C e seus conteúdos ressuspensionados em 1 ml de metanol (MERCK®) em um mesmo momento, com o intuito de se evitar que o período de contato com o solvente fosse diferente entre as diversas amostras. Segundo Khan et al.(2002) o contato da amostra extraída com o solvente orgânico poderia promover ao longo do tempo quebra de conjugados e oxidação de metabólitos, promovendo um aumento na concentração dos metabólitos na amostra. Foi realizado um piloto para averiguar tal constatação (Anexo C). Após a ressuspensão, os extratos foram homogeneizados por 1 minuto em aparelho multi vortex (VWR SCIENTIFIC PRODUCTS, VX-2500), colocados em cuba limpadora ultrassônica (ULTRA SONIC CLEANER, USC-1450-



UNIQUE) por 15 minutos e encaminhados para dosagem por radioimunoensaio. Para tanto, as amostras foram diluídas em solução tampão de PBS + gelatina ( $\text{NaPO}_4$  -13,8g, NaCl -9,0g, azida sódica -1,0g e água destilada -1000ml), em proporções que variaram de 1/20 a 1/200 para progestinas, de 1/20 a 1/40 para os metabólitos de estradiol e de 1/80 a 1/400 para corticosterona. As extrações e mensurações dos metabólitos hormonais foram realizadas no Laboratório de Dosagens Hormonais do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em São Paulo.

### 3.2.2 Percentual de recuperação

Para avaliar a eficiência da metodologia de extração empregada e a sua repetibilidade, uma vez que as extrações foram realizadas em 28 ensaios diferentes, foi realizado o procedimento de recuperação. Como só foi possível empregar esta avaliação em 15 ensaios, dada a indisponibilidade do hormônio marcado, optou-se por não usar o percentual obtido para corrigir os valores de concentração hormonal do radioimunoensaio.

Para realização da recuperação, após a pesagem, adicionou-se 100 $\mu\text{l}$  de hormônio marcado por Trício diluído em solução tampão a seis amostras, três para cada hormônio, em cada ensaio. Para as progestinas adicionou-se 10200DPM de  $^3\text{HP}_4$  (Amersham®) à 45 amostras e para os metabólitos de estradiol 4500DPM de  $^3\text{HE}_2$  (Laboratório Fleury) à 45 amostras, sendo que em seguida foi realizado o procedimento já descrito para extração. Foram então transferidas alíquotas de 100 $\mu\text{l}$  de cada hormônio marcado avaliado (total) e 100 $\mu\text{l}$  do extrato de cada amostra, para tubos contendo 3ml de líquido de cintilação (OPTIPHASE “HISAFE” 3 –WALLAC SCINTILLATION PRODUCTS) e estes levados ao Contador  $\beta$

(TRI CARB LIQUID SCINTILLATION ANALYZERS 2100TR-PACKARD INSTRUMENT CO., USA) para leitura, que foi realizada no Laboratório de Tecido Adiposo do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Para o cálculo do percentual de recuperação utilizou-se a fórmula abaixo:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{\text{DPM da amostra} \times 1000}{\text{DPM do total}} \quad \text{onde DPM= desintegrações por minuto.}$$

Este monitoramento não foi empregado para a corticosterona, já que a quantificação deste hormônio não estava prevista no projeto original e assim, as amostras do período já haviam sido extraídas.

### 3.2.3 Quantificação hormonal

A quantificação das progestinas, metabólitos de estradiol e corticosterona foi realizada utilizando-se da técnica de radioimunoensaio (RIE). O princípio desta técnica baseia-se na reação antígeno-anticorpo, usando-se como competidor o hormônio a ser dosado marcado com  $I^{125}$  (iodo radioativo). Após as etapas do ensaio a radioatividade remanescente é detectada em um contador gama computadorizado (*COBRA, MOD. AUTO-GAMMA*®), provido de *software* específico para cálculo automático dos resultados. Estes foram apresentados em nanogramas por mililitro para progestinas e corticosterona e em picogramas por mililitro para o estradiol.



Para a mensuração das progestinas e metabólitos de estradiol utilizou-se o conjunto diagnóstico de fase sólida Coat-a-Count, DPC (DIAGNOSTIC PRODUCTS CORPORATION, Los Angeles, CA, USA) desenvolvido para quantificar progesterona e estradiol em soro humano. Foram realizados 14 ensaios para progestinas e 13 para metabólitos de estradiol. Todas as amostras foram quantificadas em duplicata. Para a verificação dos coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaio foram utilizados pontos (um alto e um baixo) da curva padrão do conjunto diagnóstico. No cálculo do coeficiente inter-ensaio também utilizou-se um *pool* de extratos fecais.

Para a mensuração da corticosterona foi utilizado o conjunto comercial de duplo anticorpo ImmuChem (ICN BIOMEDICALS, INC, Costa Mesa, CA-USA) elaborado para soro de rato e camundongo. Foram realizados seis ensaios, todos em duplicata e os coeficientes de variação calculados como descrito anteriormente.

Os percentuais de reações cruzadas dos três conjuntos encontram-se descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Porcentual de reações cruzadas dos conjuntos comerciais para Radioimunoensaio para Progesterona e Estradiol da marca DPC e para Corticosterona da marca ICN (continua)

Progesterona Coat a Count DPC	
% de reação cruzada	Esteróide
100	Progesterona
9,0	5 $\alpha$ Pregnanediona
3,4	17 $\alpha$ hidroxiprogesterona
3,2	5 $\beta$ Pregnanediona
2,2	11-Deoxicorticosterona
0,9	Corticosterona
0,1	Pregnenolona
0,05	5 $\beta$ -pregnane-3 $\alpha$ -ol-20-one
0,05	5-pregnane-3 $\beta$ -ol-20-one-sulfato
Estradiol Coat a Count DPC	
% de reação cruzada	Esteróide
100	Estradiol 17 $\beta$
10,0	Estrona
0,80	Equilina
0,58	Sulfato de estrona

Tabela 1 - Porcentual de reações cruzadas dos conjuntos comerciais para Radioimunoensaio para Progesterona e Estradiol da marca DPC e para corticosterona da marca ICN (conclusão)

Corticosterona Duplo Ac ICN	
% de reação cruzada	Esteróide
100	Corticosterona
0,34	Desoxicorticosterona
0,10	Testosterona
0,05	Cortisol
0,02	Progesterona

Os valores finais de metabólitos hormonais foram corrigidos para peso e diluição e expressos em microgramas por gramas de fezes ( $\mu\text{g/g}$  de fezes) para as progestinas e para a corticosterona, e em nanogramas por gramas de fezes ( $\text{ng/g}$  de fezes) no caso dos metabólitos de estradiol.

### 3.2.4 Validação dos conjuntos diagnósticos-Paralelismo

Foi necessária a validação dos conjuntos diagnósticos da DPC para uso em extrato fecal de fêmeas de gato-mourisco, uma vez que estes foram desenvolvidos para a utilização em soro humano. Para tanto, uma curva foi obtida a partir de diluições seriadas de um *pool* de amostras (extratos fecais) e comparada com a curva padrão do conjunto diagnóstico (mesmas diluições) por meio de uma análise de regressão simples. Assim pôde-se avaliar se a matriz utilizada interfere na ligação antígeno e anticorpo.

O conjunto diagnóstico da ICN para quantificação de corticosterona já foi previamente validado para o uso em felídeos domésticos (GRAHAM; BROWN, 1996) e selvagens (STILLWELL; BROWN; GRAHAM, 1993).



### 3.2.5 Ciclos ovarianos

Para os metabólitos de estradiol, foram consideradas concentrações altas os valores que excederam a média acrescida de 1,5 desvios-padrão (DP), sendo que o valor mais alto dentro deste grupo foi considerado como pico (MOREIRA et al., 2001). A duração do ciclo estral corresponde ao intervalo de dias entre dois picos de metabólitos de estradiol (que ocorressem dentro do estro), sendo que quando este intervalo ultrapassou 106 dias, duas vezes a duração do ciclo estral baseada em observações comportamentais (MELLEN , 1993), foi considerado como período de anestro (BROWN et al., 1996; MOREIRA et al., 2001). A duração do estro foi calculada como o número de dias em que os metabólitos de estradiol se mantiveram com concentrações acima do basal (elevações) associadas a presença de pico. Para a determinação dos valores basais foi realizado um processo matemático para cada fêmea, onde os valores que excederam a média acrescida de 1,5 desvios-padrão foram excluídos. Com os valores restantes uma nova média foi calculada e o processo repetido sucessivamente até o momento em que nenhum valor excedeu o critério adotado. Por tratar-se de dados não paramétricos, a mediana dos valores que geraram a média acrescida de 1,5 desvios-padrão da primeira etapa foi comparada com a mediana dos valores das etapas seguintes e quando foi verificada diferença estatística entre esses valores determinou-se o limite entre basal e elevação.

Para as progestinas foi utilizado o mesmo critério descrito acima, exceto pelo fato da utilização de 2,0 desvios-padrão. Para caracterizar uma ovulação, os valores altos de progestinas deveriam permanecer elevados por no mínimo uma semana após um pico de metabólitos de estradiol.

Para as fêmeas que tiveram filhotes no início ou durante o projeto, foi considerado como período de lactação a data do parto até a retirada dos filhotes, mesmo que esta tenha ocorrido num período superior a 42 dias, momento a partir do qual os filhotes já se alimentam sozinhos (HULLEY, 1976). Como retirada dos filhotes entenda-se a data a partir da qual a fêmea ficou isolada, uma vez que os filhotes foram separados em momentos diferentes. Essa separação foi de acordo com as necessidades e disponibilidade de viveiros para realojar os filhotes, estabelecidas pela instituição mantenedora.

Os estros das fêmeas G1, G3, G4, G7 E G8 foram analisados quanto a sua distribuição ao longo dos meses do experimento e essa distribuição comparada com dados meteorológicos (médias mensais de: umidade relativa do ar, radiação, insolação, precipitação, temperatura, e temperaturas máximas mínimas, registradas na Estação Meteorológica do Instituto Astronômico e Geofísico da Universidade de São Paulo, IAG-USP, localizada na região da Água Funda) do referido período a fim se verificar a existência de correlação entre estes dados e os obtidos no presente estudo.

### 3.2.6 Avaliação das concentrações fecais de Corticosterona

As gatas G2, G5 que estavam gestantes no início do projeto e a G6 que deu cria no início do trabalho tiveram as concentrações de corticosterona mensuradas nas fezes nos períodos de gestação, lactação e após a retirada dos filhotes. Foi considerada como elevação na concentração deste hormônio os valores que excederam a média acrescida de 2,0 desvios-padrão (GRAHAM; BROWN, 1996). Os resultados obtidos foram comparados com os



resultados de progestinas do referido período para verificação de correlação entre os dois metabólitos.

### 3.2.7 Análise Estatística

As variáveis foram primeiramente analisadas quanto à sua distribuição pelo teste de Kolmogorov–Smirnov (teste KS) para verificação de normalidade dos resíduos, e pelo teste de Bartlett para verificação de homogeneidade de variâncias. Quando os valores não se enquadraram nestas premissas tentou-se a conversão para torná-los paramétricos. Como não foi possível a conversão seguiu-se a análise de variância não-paramétrica utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis e o pós teste de Dunn para análise de comparação múltipla. Os resultados não paramétricos foram expressos de acordo com suas medianas. Para a determinação do limite entre basal e elevação foi utilizado o teste de comparação múltipla de Dunn. Quando os dados obedeceram as premissas de normalidade utilizou-se o teste ANOVA *one-way* e o pós teste de Tukey-Kramer para análise de comparação múltipla. Os resultados paramétricos foram expressos de acordo com suas médias e erro padrão das médias (EPM). Diferença estatística foi considerada quando  $p < 0,05$ .

Para a verificação do paralelismo entre a curva do conjunto diagnóstico empregado e a curva obtida pelas diluições seriadas do pool de extratos foi realizada uma análise de regressão simples.

Para avaliar a presença de correlação entre as progestinas e a corticosterona nas fêmeas G2, G5 e G6 durante a gestação, lactação e após a retirada dos filhotes, foi utilizado o teste de Spearman ( $p < 0,05$ ) uma vez que os dados não eram paramétricos.





Os dados foram analisados utilizando o programa estatístico GraphPad InStat versão 3.0 para *Windows* (GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia –USA). Os gráficos de distribuição dos estros ao longo dos meses e da duração dos ciclos foram gerados utilizando-se o programa Minitab 13.0 para *Windows* (Minitab Inc., State College, PA-USA).



## Resultados





## 4 RESULTADOS

A seguir serão apresentados os resultados obtidos neste trabalho.

### 4.1 Recuperação

O percentual médio de recuperação ( $\pm$ EPM) obtido em 15 ensaios de extração foi de  $80,14 \pm 1,46$  ( $n=45$ ) para o estradiol marcado e de  $77,18 \pm 1,60$  ( $n=45$ ) para a progesterona marcada.

### 4.2 Validação dos conjuntos diagnósticos

Foi encontrado paralelismo entre as curvas de diluição de metabólitos de estradiol e a curva do conjunto comercial, com  $r=0,97$  e  $p<0,05$  (figura 3). Quanto a curva dos metabólitos de progesterona também verificou-se paralelismo com  $r=1$  e  $p<0,05$  (figura 4). Sendo  $r= R$  quadrado ajustado

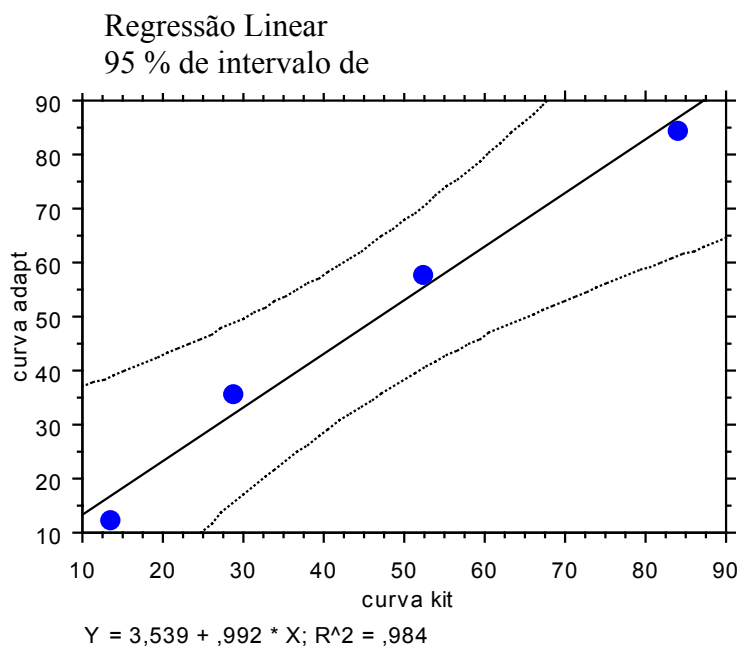


Figura 3 - Demonstração gráfica da validação do conjunto diagnóstico DPC para quantificação de metabólitos de estradiol em extratos fecais de fêmeas de gato- mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*). São Paulo, 2004

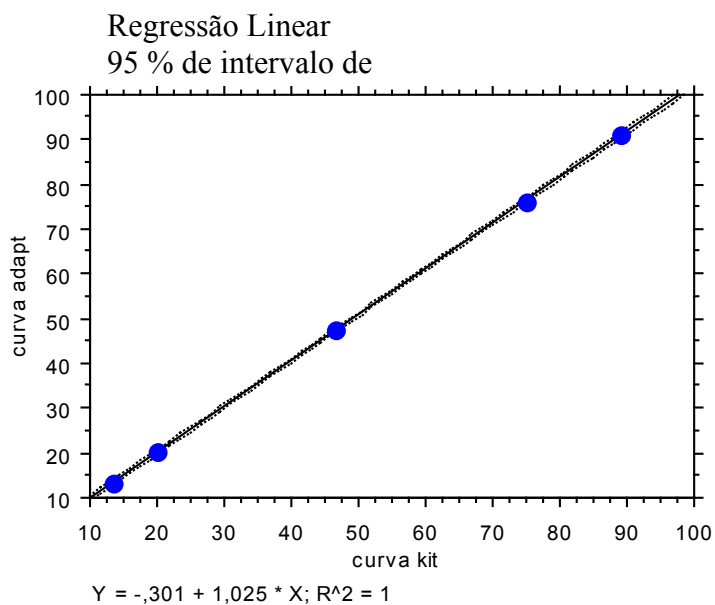


Figura 4 - Demonstração gráfica da validação do conjunto diagnóstico DPC para quantificação de metabólitos de progesterona em extratos fecais de fêmeas gato- mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*). São Paulo, 2004



### 4.3 Controle de qualidade do Radioimunoensaio

No caso dos ensaios de metabólitos de estradiol, a média dos coeficientes de variação intra-ensaio baixo foi de 17,53% e do intra-ensaio alto foi 4,18%. O coeficiente inter-ensaio ficou abaixo de 6,0%. A sensibilidade média dos ensaios e a dose mínima detectada foram de 92,7% e 1,61pg/ml respectivamente.

Para os ensaios de progestinas, a média dos coeficientes intra-ensaio baixo foi de 6,21% e do intra-ensaio alto foi de 3,92%. O coeficiente inter-ensaio foi menor do que 3,0%. A sensibilidade média dos ensaios foi de 94,4% e a dose mínima detectada 0,004ng/ml.

Tanto para progestinas, como para os metabólitos de estradiol foi utilizado *pool* de extratos fecais onde se verificou um coeficiente de variação de 10,83% e 20,97% respectivamente.

Para os ensaios de corticosterona, a média dos coeficientes intra-ensaio baixo foi de 9,90% e do intra-ensaio alto foi de 10,17% O coeficiente de variação inter-ensaio foi menor do que 9,0%. A sensibilidade média dos ensaios foi de 94,3% e a dose mínima detectada de 2,51ng/ml.

### 4.4 Perfis hormonais de progestinas e metabólitos de estradiol

Foram colhidas, extraídas e quantificadas um total de 1174 amostras oriundas de oito fêmeas de gato-mourisco. O detalhamento do número de amostras por fêmea encontra-se descrito na tabela 2.



Tabela 2 - Número de amostras colhidas por fêmea de gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*) durante os 9 meses de estudo longitudinal. São Paulo, 2004

<b>Viveiro</b>	<b>Cadastro do animal</b>	<b>Amostras</b>
G1	26005	144
G2	20762	150
G3	21566	159
G4	27156	157
G5	25244	131
G6	23120	147
G7	24142	142
G8	23851	144

As concentrações e perfis de metabólitos de estradiol e de progestinas fecais de cada indivíduo e médias gerais serão apresentadas a seguir.

Na fêmea G1-26005 foram observados 7 ciclos com duração média ( $\pm$ EPM) de  $15,71 \pm 2,76$  dias (variando de 6 a 25 dias). A duração do estro foi de  $7,11 \pm 0,45$  dias ( $n=9$ ) com variação de 6 a 10 dias. Entre o primeiro e o segundo estro foi verificado um período de anestro. Em relação as progestinas ocorreram picos, no entanto sem significado biológico. O perfil dos metabólitos estudados encontra-se na figura 5.



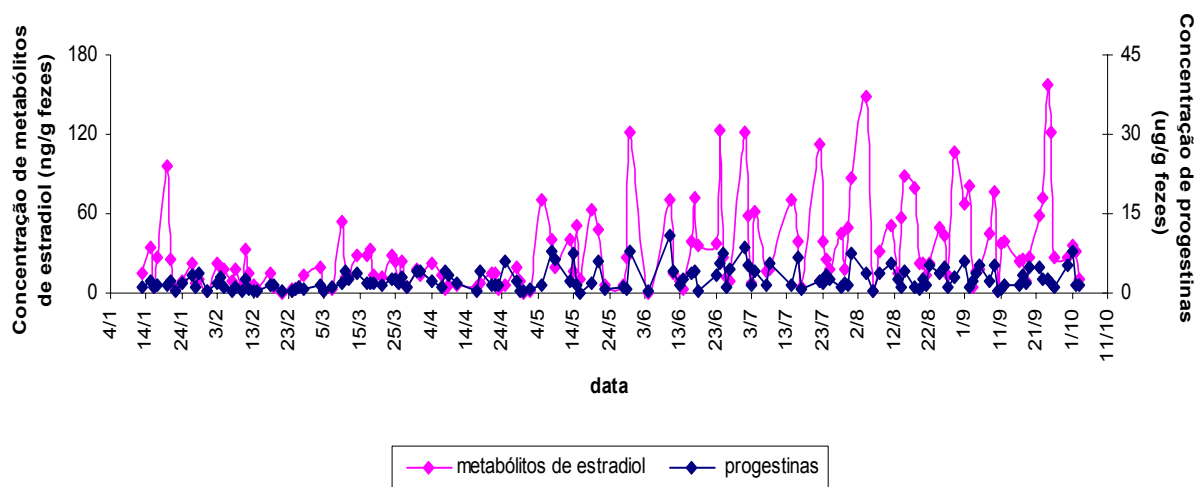


Figura 5 - Perfil dos metabólitos de estradiol e progesterinas fecais da fêmea G1 de gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*) durante nove meses de colheita. São Paulo, 2004

A fêmea G2-20762 encontrava-se prenhe no início do experimento, fato esse constatado por exame ultrassonográfico em 06/02/2003. Foram visualizadas duas vesículas sendo que em apenas uma foi detectado batimento cardíaco. Houve o nascimento de um filhote em 16/03/2003. Avaliando a gestação, foi encontrada diferença estatística entre a média dos metabólitos de estradiol da primeira e terceira fase e entre segunda e terceira fase, constatando-se um aumento significativo deste metabólito no terço final da gestação. Não houve diferença significativa de concentração de progesterinas entre as fases da gestação (tabela 4). Comparando a gestação e a lactação, os metabólitos de estradiol encontravam-se mais altos na gestação e as progesterinas não apresentaram diferença nos dois eventos (tabela 3).





Tabela 3 - Medianas das concentrações de metabólitos de estradiol e progestinas fecais da fêmea G2 de gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*) durante a gestação e a lactação. São Paulo, 2004

	Metabólitos de estradiol (ng/g de fezes)	Progestinas (ug/g de fezes)
Gestação (n=43)	17,66 <sup>a</sup>	1,57 <sup>a</sup>
Lactação (n=107)	6,00 <sup>b</sup>	1,79 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup>Valores com diferentes sobrescritos, na mesma coluna, diferem significativamente (p<0,05)

Tabela 4 - Concentrações médias±EPM de metabólitos de estradiol e progestinas fecais da fêmea G2 de gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*) durante as fases da gestação. São Paulo, 2004

	Metabólitos de estradiol (ng/g de fezes)	Progestinas (ug/g de fezes)
1°Terço Gestação (n=8)	15,65±4,63 <sup>a</sup>	2,03±0,46 <sup>a</sup>
2°Terço Gestação (n=18)	17,01±2,94 <sup>a</sup>	2,13±0,33 <sup>a</sup>
3°Terço Gestação (n=18)	38,56±6,62 <sup>b</sup>	1,00±0,19 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup>Valores com diferentes sobrescritos, na mesma coluna, diferem significativamente (p<0,05)

Foi verificada a ocorrência de atividade ovariana com concentrações de metabólitos de estradiol atingindo valor de pico 65 dias após do parto (20/05/2003). A média ±EPM da duração do ciclo estral foi de 11,33±1,85 dias (n=3 ciclos, variando de 9 a 15 dias), e do estro de 8,00±0,57 dias (n=3, variação de 7 a 9 dias). Não houve retirada do filhote. O perfil desta fêmea ao longo do estudo longitudinal encontra-se na figura 6.



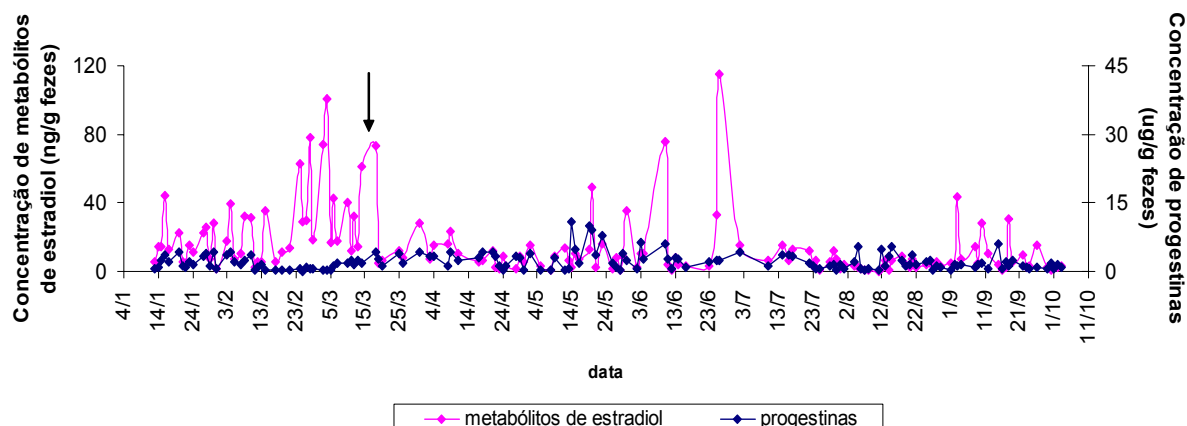


Figura 6 - Perfil dos metabólitos de estradiol e progesterinas fecais da fêmea G2 de gato-mourisco, (*Herpailurus yagouaroundi*) durante 9 meses de colheita. Parto indicado pela seta preta. São Paulo, 2004

Na fêmea G3-21566 foram observados 4 ciclos com duração média $\pm$ EPM de 51,75 $\pm$ 13,51 dias (variação de 23 a 82 dias). Quanto a duração do estro, a média $\pm$ EPM foi de 9,60 $\pm$ 0,81 dias (n=5, variando de 7 a 12 dias). As progesterinas apresentaram concentrações de pico, mas que não se sustentaram ao longo dos dias. O perfil destes metabólitos está exibido na figura 7.

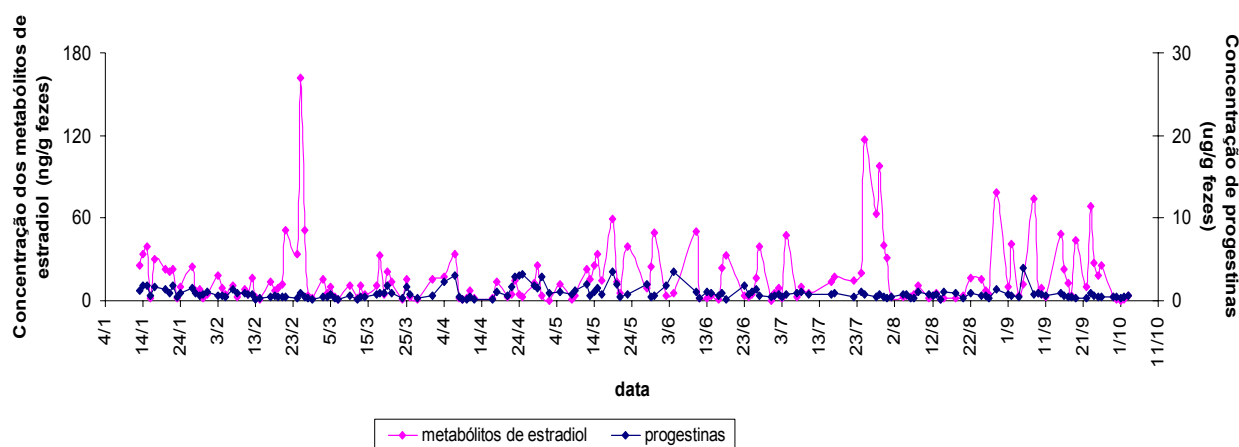


Figura 7 - Perfil dos metabólitos de estradiol e progesterinas fecais da fêmea G3 de gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*) durante 9 meses de colheita. São Paulo, 2004



Na fêmea G4-27156 a duração média±EPM do ciclo estral foi de 37,80±12,65 dias (n=5, variação de 10 a 78 dias), e do estro foi de 9,17±0,83 dias (n=6, variação de 7 a 13 dias). Podê-se observar concentrações de pico nas progesterinas, mas no entanto sem correlação com evento biológico. O perfil dos metabólitos estudados encontra-se na figura 8.

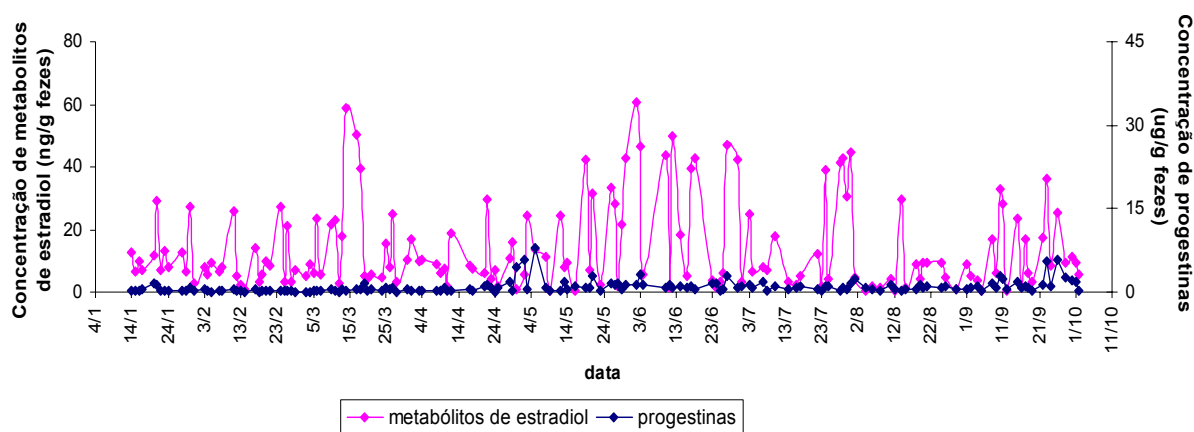


Figura 8 - Perfil dos metabólitos de estradiol e progesterinas fecais da fêmea G4 de gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*) durante 9 meses de coleta. São Paulo, 2004

A fêmea G5-25244 também se encontrava gestante no início do projeto, fato constatado por exame ultrassonográfico em 07/02/2003, que permitiu identificação de dois filhotes. O nascimento dos dois ocorreu em 25/03/2003. Houve aumento significativo na concentração dos metabólitos de estradiol no terço final da gestação (tabela 6), que caiu durante a lactação (tabela 5), e um aumento na concentração de progesterona no período de lactação em relação ao período de gestação. Entre as fases da gestação não houve diferença nas concentrações das progesterinas.



Tabela 5 - Mediana das concentrações de metabólitos de estradiol e progestinas fecais da fêmea G5 de gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*) durante a gestação, lactação e após a retirada dos filhotes. São Paulo, 2004

	Metabólitos de estradiol (ng/g de fezes)	Progestinas (ug/g de fezes)
Gestação (n=30)	47,45 <sup>a</sup>	0,77 <sup>a</sup>
Lactação (n=55)	7,13 <sup>b</sup>	2,10 <sup>b</sup>
Pós-retirada dos filhotes (n=46)	13,01 <sup>ab</sup>	1,39 <sup>ab</sup>

<sup>a,b</sup>Valores com diferentes sobrescritos, na mesma coluna, diferem significativamente ( $p < 0,05$ )

Tabela 6 - Concentrações médias $\pm$ EPM de metabólitos de estradiol e progestinas fecais da fêmea G5 de gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*) durante as fases da gestação. São Paulo, 2004

	Metabólitos de estradiol (ng/g de fezes)	Progestinas (ug/g de fezes)
1º Terço Gestação	NC	NC
2º Terço Gestação (n=15)	30,45 $\pm$ 10,41 <sup>a</sup>	0,68 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>
3º Terço Gestação (n=15)	171,54 $\pm$ 28,85 <sup>b</sup>	0,85 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup>Valores com diferentes sobrescritos, na mesma coluna, diferem significativamente ( $p < 0,05$ )  
NC-não coletado, período anterior ao início do projeto.

Na data de 20/05/2003, 84 dias após o parto, foi observada atividade ovariana com concentrações de metabólitos de estradiol com valores de pico. A duração deste primeiro estro pós-parto aconteceu com a presença de um filhote, mas sua duração não pôde ser calculada uma vez que não dispomos de alguns valores que precedem o pico. De 06/05/2003 a 13/05/2003 não houve colheita, pois um filhote adoeceu (diarréia e hiporexia) e a fêmea e o outro filhote foram transferidos com ele para o setor de Veterinária da instituição mantenedora, fato que impossibilitou a colheita. Este filhote doente foi a óbito e a fêmea



retornou com o outro filhote para o viveiro onde era mantida. Outras 2 lacunas nas colheitas ocorreram nos períodos de 30/05/2003 a 12/06/2003 e de 09/07/2003 a 16/07/2003. No primeiro, a fêmea e o filhote foram para a Divisão de Veterinária por motivo de doença do filhote, sendo que no segundo a fêmea também apresentou diarreia. O filhote foi a óbito na data de 10/07/2003, e a fêmea ficou em tratamento até 16/07/2003, quando retornou ao seu viveiro e as colheitas foram restabelecidas.

A duração média do ciclo estral desta fêmea não foi calculada uma vez que esta apresentou um período de longo (118 dias) entre o primeiro e segundo pico e apenas 1 ciclo subsequente, que teve duração de 6 dias. A duração média $\pm$ EPM do estro foi de 11,50 $\pm$ 0,50 dias, calculada com base em 2 estros. Verificou-se que nos dias que sucediam o retorno do setor de Veterinária as progestinas apresentaram valores elevados, considerados picos, mas que não se mantiveram altos, como outros picos que ocorreram ao longo do estudo. O perfil do acompanhamento longitudinal dos metabólitos de estradiol e progestinas são apresentados na figura 9.

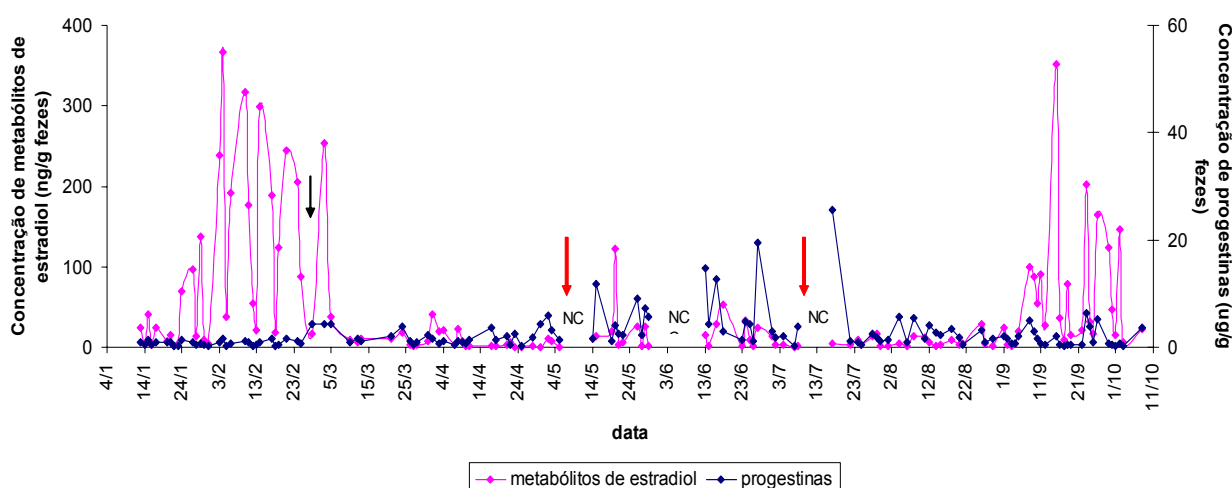


Figura 9 - Perfil dos metabólitos de estradiol e progestinas fecais da fêmea G5 de gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*) durante 9 meses de colheita. A seta preta indica o parto. NC indica que não houve colheita no referido período. Cada seta vermelha indica a retirada de um filhote. São Paulo, 2004



A fêmea G6-23120 pariu 3 filhotes dois dias após o início do experimento. A concentração de estradiol nos dias que antecederam o parto foi alta e caiu no período de lactação. Como só dispúnhamos de dois valores de gestação não foram aplicados testes estatísticos para comparar este período com os demais. Comparando a lactação e o período após a retirada dos filhotes, não houve diferença entre as medianas das concentrações de metabólitos de estradiol. A concentração média de progestinas se mostrou significativamente elevada durante o período de lactação, quando comparada com o período após a retirada dos filhotes (tabela 7).

Tabela 7 - Concentrações médias±EPM de metabólitos de estradiol e progestinas fecais da fêmea G6 de gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*) durante a gestação, lactação e após a retirada dos filhotes. São Paulo, 2004

	Metabólitos de estradiol (ng/g de fezes)	Progestinas (ug/g de fezes)
Gestação	-	-
Lactação (n=64)	15,23 <sup>a</sup>	6,10 <sup>a</sup>
Pós-retirada dos filhotes (n=22)	11,88 <sup>a</sup>	1,71 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup>Valores com diferentes sobrescritos, na mesma coluna, diferem significativamente ( $p < 0,05$ )

“-“ apenas dois valores disponíveis para o período.

Atividade ovariana, apresentando concentrações de pico dos metabólitos de estradiol, foi observada 130 dias após o parto. A duração média±EPM do ciclo estral encontrada foi de  $36,33 \pm 14,14$  dias ( $n=3$ , variação de 12 a 61 dias) e do estro foi de  $8,75 \pm 1,65$  dias ( $n=4$ , variação de 5 a 13 dias). Houve uma lacuna na colheita no período de 01/05/2003 a 08/05/2003, dada a internação de um filhote e da fêmea no setor de Veterinária da instituição mantenedora. Ambos apresentavam quadro de diarreia e vômito. O filhote foi a óbito no dia 02/05/2003 e a fêmea retornou ao seu viveiro em 14/05/2003, restabelecendo-se a colheita a



partir do dia seguinte. Foi observado aumento nas concentrações de progestinas (valores de pico) do 09/05/2003 ao dia 14/05/2003, período em que a fêmea ainda estava no setor de veterinária, mas que foi possível realizar a colheita. Os outros dois filhotes foram retirados em 23/05/2003. Na figura 10 encontra-se o perfil dos metabólitos hormonais estudados .

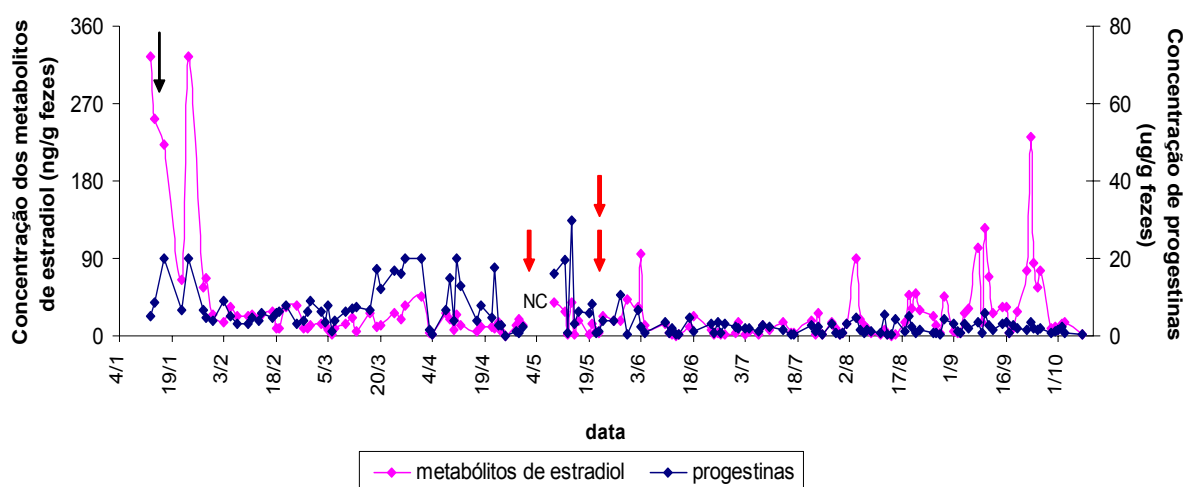


Figura 10 - Perfil dos metabólitos de estradiol e progestinas fecais da fêmea G6 de gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*) durante 9 meses de colheita. A seta preta indica o parto. NC indica que não houve colheita no referido período. Cada seta vermelha indica a retirada de um filhote. São Paulo, 2004

Na fêmea G7-24142 a duração média±EPM do ciclo estral encontrada foi de 36,50±10,19 dias (n=6, variação de 13 a 81 dias) e do estro foi de 8,14±1,24 dias (n=7, variação de 5 a 13 dias). Quanto as progestinas foram observados valores de pico, mas sem significado biológico. O perfil de metabólitos de estradiol e progestinas desta fêmea encontra-se na figura 11.



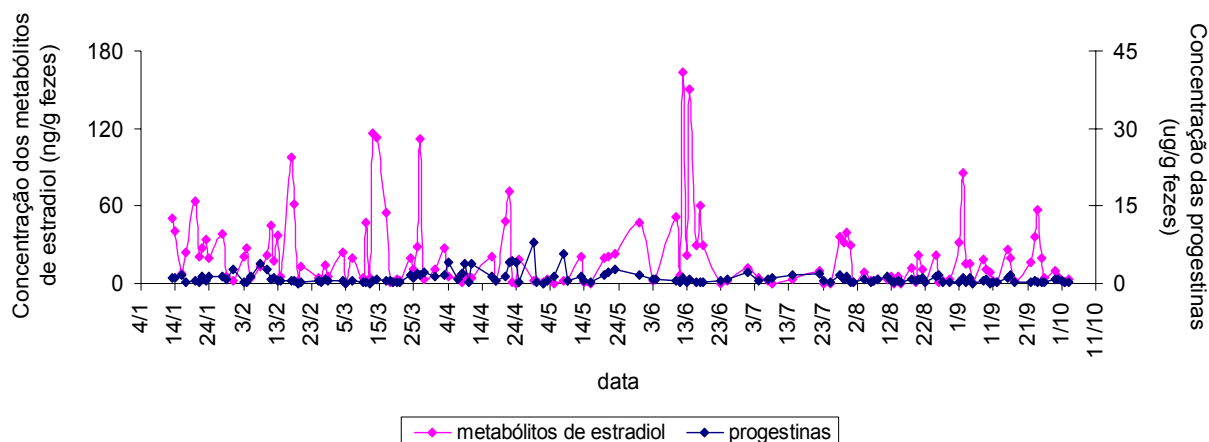


Figura 11 - Perfil dos metabólitos de estradiol e progesterinas fecais da fêmea G7 de gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*) durante 9 meses de colheita. São Paulo, 2004

Na fêmea G8-23851 foram observados 4 ciclos, com duração média±EPM de  $40,00 \pm 12,62$  dias (variação de 14-74 dias). Apresentou um intervalo entre picos de estradiol de 118 dias que foi considerado como anestro. A duração média±EPM do estro foi de  $9,80 \pm 1,35$  dias ( $n=5$ , variação de 6 a 14 dias). As concentrações de progesterinas apresentaram picos, no entanto que não se sustentaram ao longo dos dias, e sem significado biológico. O perfil encontrado para os metabólitos de estradiol e progesterinas está na figura 12.





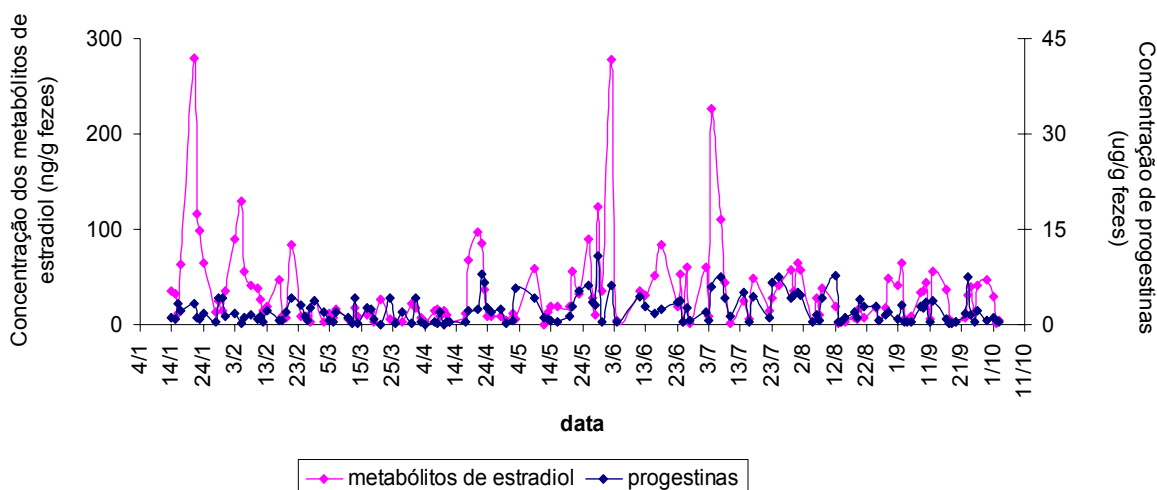


Figura 12 - Perfil dos metabólitos de estradiol e progesterona fecais da fêmea G8 de gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*) durante 9 meses de colheita. São Paulo, 2004

Quando os dados das fêmeas (n=8) foram analisados em conjunto, o valor da mediana para o ciclo estral (n=33), definido pelo intervalo entre dois picos consecutivos de metabólitos fecais de estradiol, encontrado no presente estudo foi de 24 dias, variando de 6 a 82 dias. Setenta e cinco por cento destes ciclos tiveram duração entre 6 e 45 dias. A representação gráfica da distribuição da duração dos ciclos encontra-se na figura 13. Foram encontrados intervalos entre picos de metabólitos de estradiol com duração de 6 a 128 dias, no entanto os valores acima de 106 dias foram considerados como anestro, e não foram considerados para compor a duração do ciclo. A duração do estro (n=41) foi de  $8,65 \pm 0,38$  dias, variando de 5 a 14 dias. Na figura 14 está representada graficamente a frequência de cada duração de estro encontrada. Nas tabelas 8 e 9 são apresentados os valores mínimos, máximos, basais e de pico, de metabólitos de estradiol e progesterona respectivamente, encontrados para cada fêmea. A tabela 10 mostra as concentrações médias de valores basais e de pico para cada fêmea. Na tabela 11 estão apresentadas as medianas, concentrações máximas e mínimas dos valores basais e de pico, encontradas para fêmeas de gato-mourisco neste estudo.



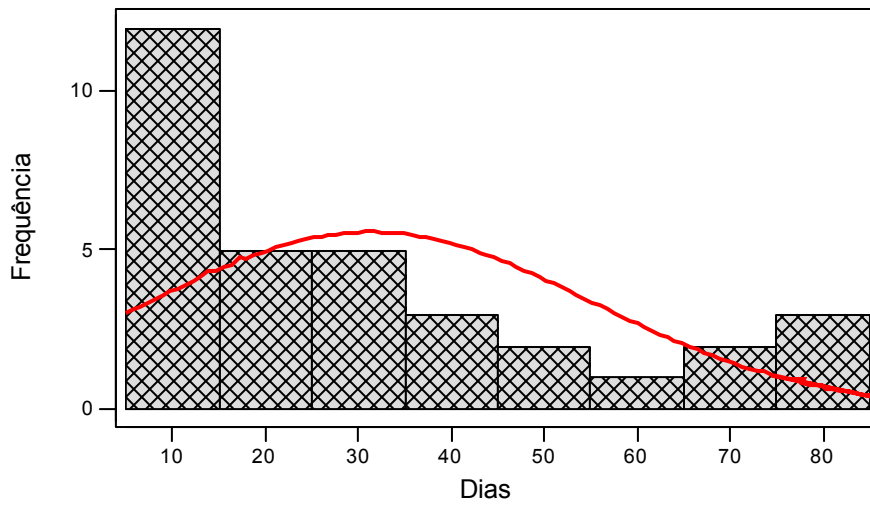


Figura 13 - Histograma da frequência de duração de ciclos com curva de normalidade de fêmeas de gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*). São Paulo, 2004

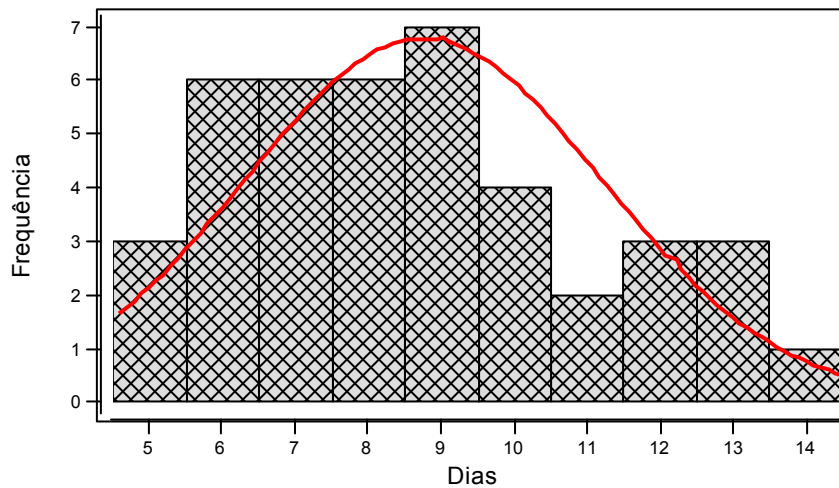


Figura 14 - Histograma da frequência de duração de estros com curva de normalidade de fêmeas de gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*). São Paulo, 2004



Tabela 8 - Concentrações mínimas, máximas, basais e de pico para metabólitos de estradiol fecais, encontradas para cada fêmea de gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*) durante 9 meses de colheita. São Paulo, 2004

Animal	Metabólitos de estradiol (ng/g de fezes)			
	mínimo	máximo	basal	pico
G1	0,41	157,32	0,41-24,15	> 79,16
G2	0,32	114,91	0,32-7,14	>32,27
G3	0,27	161,92	0,27-11,29	>50,22
G4	0,38	60,76	0,38-9,71	> 35,06
G5	0,28	352,32	0,28-6,36	>99,92
G6	0,41	231,34	0,41-14,73	>62,95
G7	0,38	163,56	0,38-8,40	> 62,96
G8	0,51	279,23	0,51-17,95	> 98,38

Tabela 9 - Concentrações mínimas, máximas, basais e de pico para progestinas fecais, encontradas para cada fêmea de gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*) durante 9 meses de colheita. São Paulo, 2004

Animal	Progestinas (ug/g de fezes)			
	mínimo	máximo	basal	pico
G1	0,15	10,96	0,15-3,41	> 6,82
G2	0,25	10,90	0,25-3,26	>5,44
G3	0,12	4,02	0,12-0,86	>1,96
G4	0,08	8,00	0,08-0,95	>3,14
G5	0,13	25,64	0,13-2,82	>10,67
G6	0,08	29,82	0,08-4,91	>14,53
G7	0,07	8,00	0,07-1,07	>3,39
G8	0,05	10,85	0,05-2,63	>6,34



Tabela 10 - Concentrações médias±EPM dos valores basais e de pico dos metabólitos de estradiol e progestinas fecais de cada fêmea de gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*) durante 9 meses de colheita. São Paulo, 2004

Animal	Metabólitos de estradiol (ng/g de fezes)		Progestinas (ug/g de fezes)	
	Basal	Pico	Basal	Pico
G1	11,58±0,89	111,17±6,87	1,57±0,08	8,06±0,39
G2	3,75±0,27	61,50±15,4	1,46±0,10	7,77±0,72
G3	5,26±0,39	83,82±12,18	0,55±0,02	3,04±0,18
G4	5,33±0,29	45,07±1,53	0,43±0,02	5,94±0,57
G5	3,08±0,31	185,32±35,55	1,28±0,09	16,88±2,56
G6	7,31±0,53	105,56±16,69	2,13±0,13	18,97±1,22
G7	3,65±0,35	108,13±11,18	0,51±0,02	4,74±0,45
G8	9,17±0,65	180,29±29,38	1,09±0,07	7,81±0,54

Tabela 11 - Mediana, concentrações máximas e mínimas para valores basais e de pico encontrados para fêmeas de gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*) no presente estudo. São Paulo, 2004

	Metabólitos de estradiol (ng/g de fezes)			Progestinas (ug/g de fezes)		
	Mediana	Mínimo	Máximo	Mediana	Mínimo	Máximo
Basal	4,67 (n=610)	0,27	25,97	0,75 (n=736)	0,05	5,51
Pico	87,32 (N=76)	32,72	352,32	7,49 (N=64)	2,05	29,82

Foram observados estros em todos os meses, com um discreto aumento nos meses de junho e julho, mas sem significado estatístico. A distribuição dos estros ao longo do período estudado encontra-se na figura 15. As fêmeas que gestaram no início do experimento não



tiveram os seus dados considerados para a composição do gráfico desta figura, já que contribuiriam apenas com os meses posteriores ao desmame.

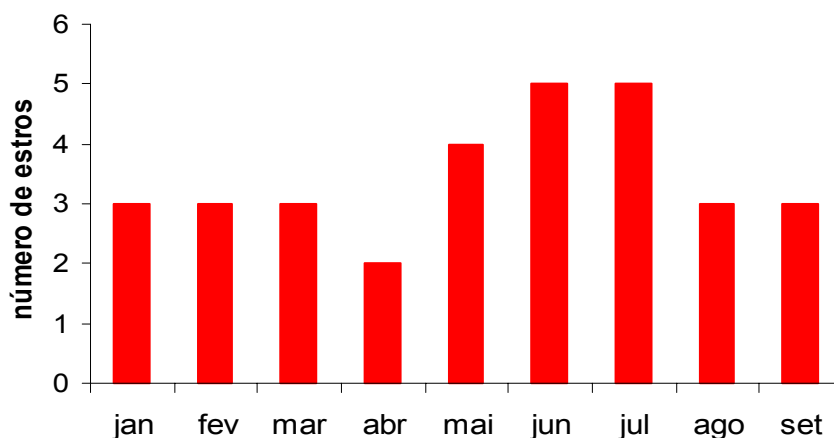


Figura 15 - Distribuição dos estros de gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*) ao longo dos meses do ano, durante o presente estudo. São Paulo, 2004

Essa distribuição foi comparada com dados meteorológicos do referido período, que se encontram na tabela 12 e figuras 16, 17 e 18. Foi observada apenas uma correlação fraca,  $r=0,59$ , entre a distribuição dos estros ao longo dos meses e temperatura máxima.

Tabela 12 - Dados meteorológicos do período de colheita do presente estudo.

Mês	Umid.Rel. (%)	Radiação (MJ/m <sup>2</sup> )	Insolação (Horas)	Precipitação (mm)	Temperatura (Celsius)	Temp.Max. (Celsius)	Temp.min. (Celsius)
Jan	83,4	494,6	98,3	265,3	22,2	34,5	13,8
Fev	77,1	614,3	217,9	160,7	24,2	34,3	17,1
Mar	81,6	523,3	150,8	110,8	21,8	34,6	15,2
Abr	80,8	447,8	169,3	87,6	20,3	31,2	9,8
Mai	76,9	443,3	205,9	24,6	17,3	29,1	6,9
Jun	79,0	374,6	199,7	20,4	18,1	27,8	9,5
Jul	74,3	394,5	195,2	15,0	16,7	29,0	8,5
Ago	77,5	410,6	168,0	26,1	15,1	31,2	3,7
Set	78,2	465,4	152,8	32,7	17,4	34,1	8,8

Fonte: Instituto Astronômico e Geofísico da Universidade de São Paulo, 2004.



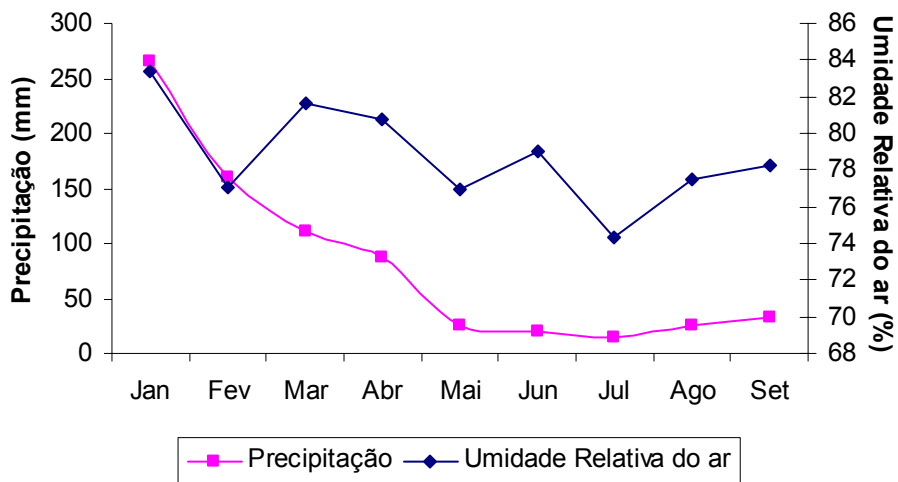


Figura 16 - Médias mensais de precipitação e umidade relativa do ar no ano de 2003, durante o período de colheita das amostras do presente estudo  
 Fonte: Instituto Astronômico e Geofísico da Universidade de São Paulo, 2004.

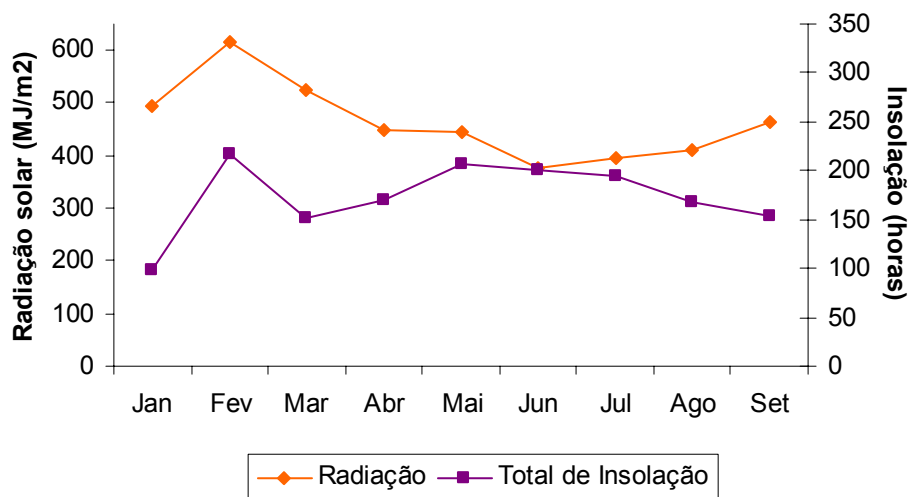


Figura 17- Médias mensais de radiação e insolação no ano de 2003, durante o período de colheita das amostras do presente estudo  
 Fonte: Instituto Astronômico e Geofísico da Universidade de São Paulo, 2004.



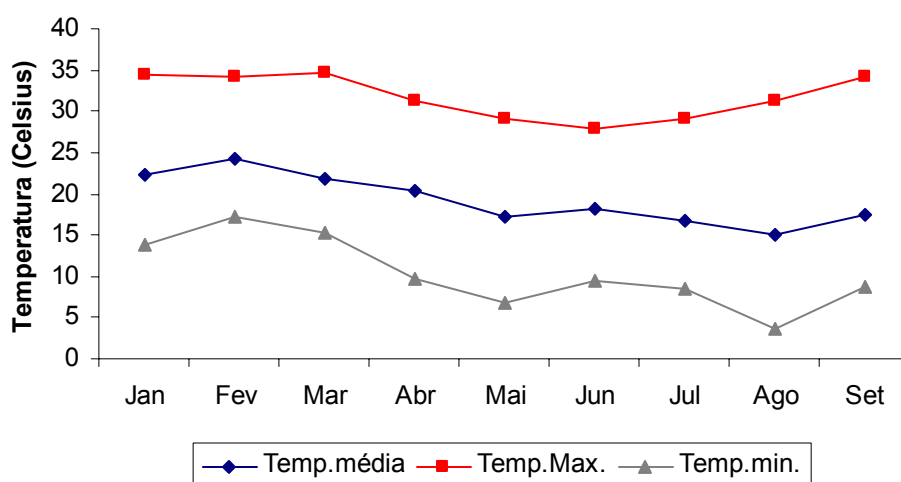


Figura 18 - Médias mensais de temperatura e temperaturas máximas e mínimas no ano de 2003, durante o período de colheita das amostras do presente estudo  
Fonte: Instituto Astronômico e Geofísico da Universidade de São Paulo, 2004.

Os eventos gestação (e suas fases), lactação e pós-retirada dos filhotes também foram analisados utilizando-se os dados obtidos das fêmeas em conjunto.

Verificou-se em relação as concentrações médias de progesterona, que não houve diferença entre as fases da gestação (tabela 14). Comparando as medianas verificou-se que também não houve diferença entre a gestação e o período após a retirada dos filhotes. No entanto, um aumento significativo foi encontrado durante a lactação (tabela 13).

Quanto aos metabólitos de estradiol foi observado um aumento significativo no terço final da gestação (tabela 14). Durante a gestação a média das concentrações foram significativamente maiores do que nos outros períodos (tabela 13).



Tabela 13- Mediana das concentrações de metabólitos de estradiol e progestinas fecais das fêmeas de gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*) em conjunto, durante a gestação, lactação e após a retirada dos filhotes. São Paulo, 2004

	Metabólitos de estradiol (ng/g de fezes)	Progestinas (ug/g de fezes)
Gestação (n=75)	24,11 <sup>a</sup>	0,94 <sup>a</sup>
Lactação (n=226)	7,92 <sup>b</sup>	2,59 <sup>b</sup>
Pós-retirada dos filhotes (n=127)	12,39 <sup>b</sup>	1,55 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup>Valores com diferentes sobrescritos, na mesma coluna, diferem significativamente ( $p < 0,05$ )

Tabela 14 - Concentrações médias $\pm$ EPM de metabólitos de estradiol e progestinas fecais das fêmeas de gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*) em conjunto durante as fases da gestação. São Paulo, 2004

	Metabólitos de estradiol (ng/g de fezes)	Progestinas (ug/g de fezes)
1º Terço Gestação (n=8)	15,64 $\pm$ 4,63 <sup>a</sup>	2,02 $\pm$ 0,46 <sup>a</sup>
2º Terço Gestação (n=33)	23,11 $\pm$ 5,04 <sup>a</sup>	1,46 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>
3º Terço Gestação (n=34)	111,92 $\pm$ 18,79 <sup>b</sup>	1,27 $\pm$ 0,27 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup>Valores com diferentes sobrescritos, na mesma coluna, diferem significativamente ( $p < 0,05$ )

#### 4.5 Corticosterona

Na fêmea G2-20762 foram observados dois valores de pico, que ocorreram nos dias 24/01/2003 e 26/05/2003. Não houve aumento nas proximidades do parto, que ocorreu em





16/03/2003. Não houve a retirada do filhote. O perfil de corticosterona encontrado está na figura 19.

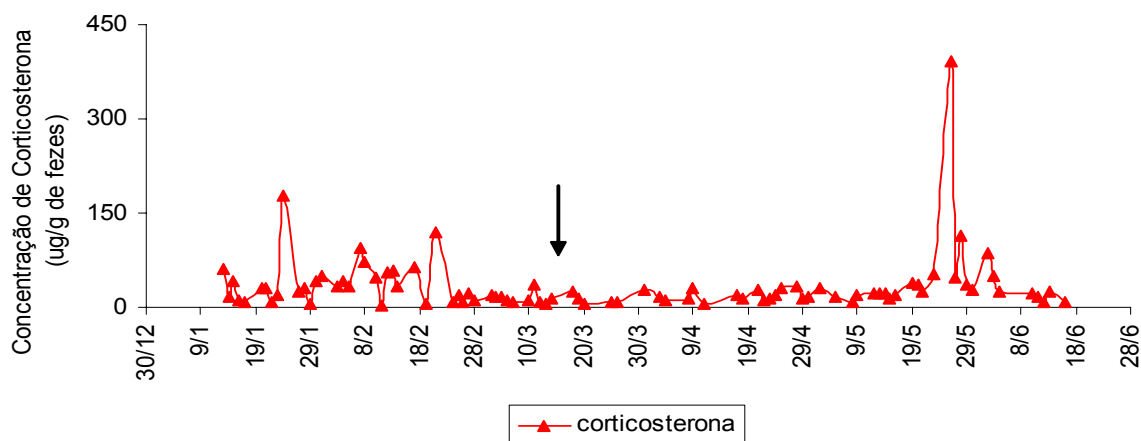


Figura 19 - Perfil de corticosterona fecal da fêmea G2 de gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*) durante a gestação e lactação. São Paulo, 2004

Quando as medianas do período de gestação e lactação foram comparadas não encontrou-se diferença. As medianas e os valores mínimos e máximos de cada período estão na tabela 15.

Tabela 15 - Mediana das concentrações, valores mínimos e valores máximos de corticosterona fecal da fêmea G2 de gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*) na gestação e lactação. São Paulo, 2004

	Corticosterona (ug/g fezes)		
	mediana	mínimo	máximo
Gestação (n=43)	22,03	1,74	178,54
Lactação (n=47)	20,94*	4,37	390,34
Pós-retirada do filhote	NC	NC	NC

\* $p > 0,05$  referente aos períodos de gestação e lactação.

NC-não coletado, período posterior ao término do projeto.



NC-não coletado, período posterior ao término do projeto.

Não foi encontrada correlação entre corticosterona e progestinas fecais durante o período total observado, nem nos períodos isolados. Na figura 20 temos os perfis destes metabólitos ao longo tempo.

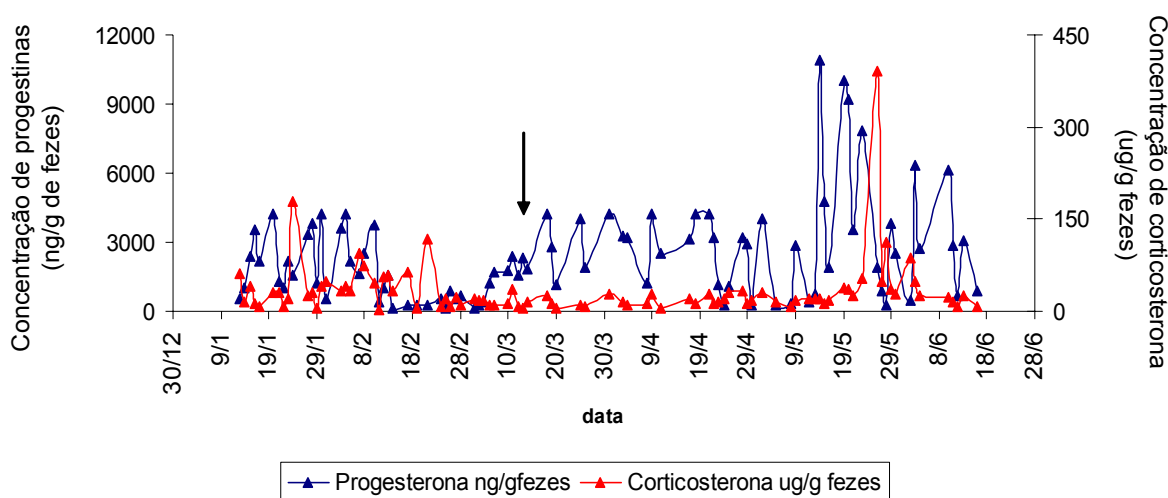


Figura 20 - Perfil de corticosterona e progestinas fecais da fêmea G2 de gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*) durante a gestação e lactação. A seta preta indica o parto. São Paulo, 2004

Na Fêmea G5-25244 observou-se 3 valores de pico de corticosterona fecal, que aconteceram nos dias 15/01/2003, 04/02/2003 e 21/02/2003. Este último próximo ao parto que ocorreu em 25/02/2003. Esta fêmea foi levada ao setor de veterinária em 3 momentos ao longo do projeto, promovendo 3 lacunas na colheita. Após o retorno da primeira transferência, na data de 13/05/2003 houve um aumento nas concentrações fecais de corticosterona, mas que não constituiu pico. Os filhotes foram retirados (óbito) nas datas de 08/05/2003 e 10/07/2003. O perfil está exibido na figura 21.



Comparando as medianas das concentrações de corticosterona na gestação, lactação e após a retirada do filhote verificou-se que a da gestação foi superior a dos outros períodos (tabela 16).

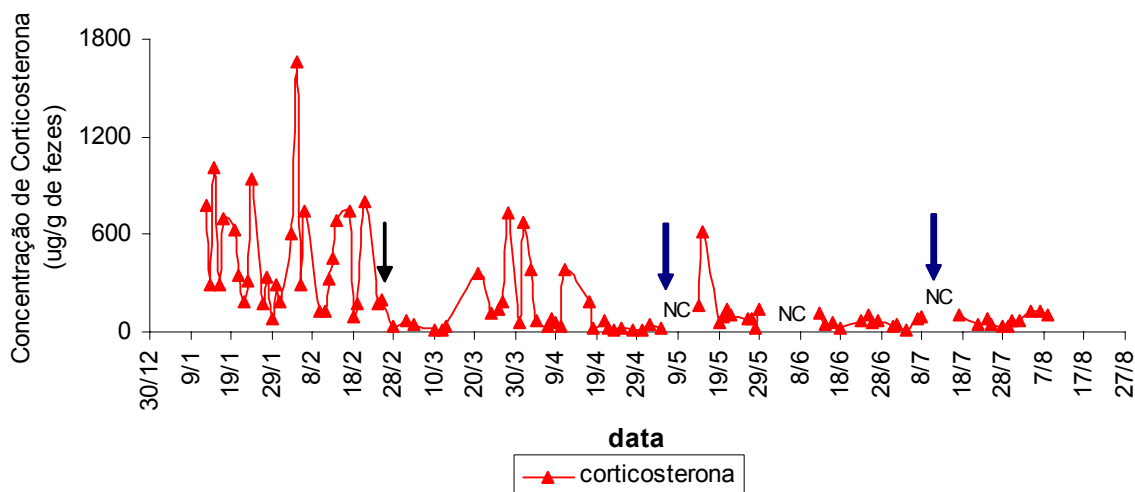


Figura 21 - Perfil de corticosterona fecal da fêmea G5 de gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*) durante a gestação, lactação e após a retirada dos filhotes. A seta preta indica o parto. NC indica que não houve colheita no referido período. Cada seta larga (azul) indica a retirada de um filhote. São Paulo, 2004

Tabela 16 - Mediana das concentrações, valores mínimos e máximos de corticosterona fecal da fêmea G5 de gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*) na gestação, lactação e após a retirada dos filhotes. São Paulo, 2004

	Corticosterona (ug/g fezes)		
	mediana	mínimo	máximo
Gestação (n=30)	318,34 <sup>a</sup>	85,86	1659,50
Lactação (n=53)	65,24 <sup>b</sup>	8,06	730,91
Após a retirada dos filhotes (n=11)	66,96 <sup>b</sup>	32,36	129,05

<sup>a,b</sup>Valores com diferentes sobrescritos, na mesma coluna, diferem significativamente ( $p < 0,05$ )



<sup>a,b</sup>Valores com diferentes sobrescritos, na mesma coluna, diferem significativamente ( $p < 0,05$ )

Avaliando o período total, não houve correlação entre a corticosterona e as progesterinas. No entanto durante a gestação pôde-se observar correlação, com  $r = 0,68$ ,  $p < 0,05$ . Nos dias que sucederam o retorno da primeira transferência para o setor de veterinária foi constatada correlação entre estes metabólitos, com  $r = 0,94$ ,  $p < 0,05$ . O perfil destes metabólitos é mostrado na figura 22.

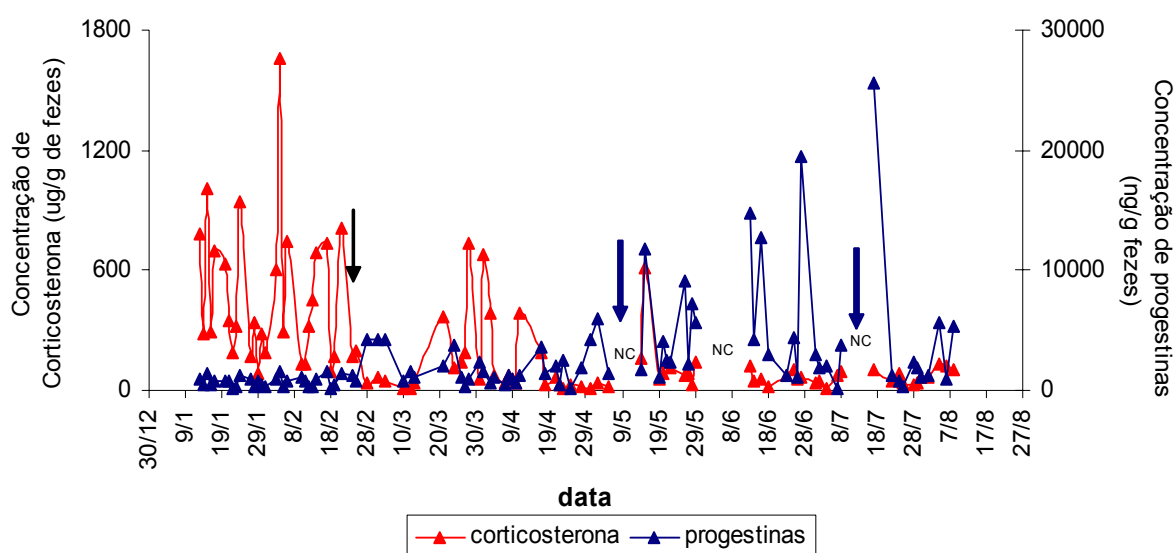


Figura 22 - Perfil de corticosterona e progesterinas fecais da fêmea G5 de gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*) durante a gestação, lactação e após a retirada dos filhotes. A seta preta indica o parto. NC indica que não houve colheita no referido período. Cada seta larga (azul) indica a retirada de um filhote. São Paulo, 2004

Na fêmea G6-23120 foram observados picos nos dias 9, 12, 14, 16 e 20 do mês de maio de 2003, sendo que o dia 9 sucede uma lacuna na colheita devido ao fato da fêmea ter sido transferida para o Setor de Veterinária, para acompanhar um filhote doente, que foi a óbito em 03/05/2003, retornando ao seu viveiro no dia 14/05/2003. Os outros dois filhotes foram separados no dia 23/05/2003. Na figura 23 temos o perfil de corticosterona durante a lactação e após a retirada dos filhotes. As medianas e valores mínimos e máximos de cada período (lactação e após retirada dos filhotes) encontra-se na tabela 17.



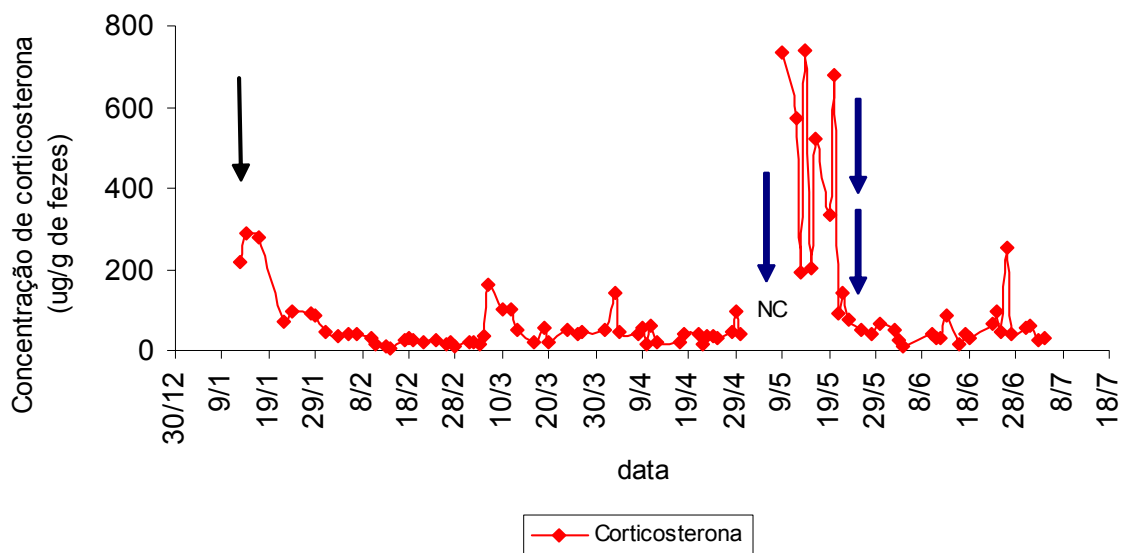


Figura 23 - Perfil de corticosterona fecal da fêmea G6 de gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*) durante a lactação e após a retirada dos filhotes. A seta preta indica o parto. NC indica que não houve colheita no referido período. Cada seta azul indica a retirada de um filhote. São Paulo, 2004

Não foi encontrada correlação entre as concentrações de corticosterona e progesterinas analisando o período total, e nem nos períodos individualizados. No entanto, enquanto estava internada no setor de Veterinária e nos dias subsequentes ao seu retorno ao viveiro foi encontrada correlação com  $r=0,77$ ,  $p<0,05$ . O perfil destes metabólitos durante a lactação e após a retirada dos filhotes é apresentado na figura 24.



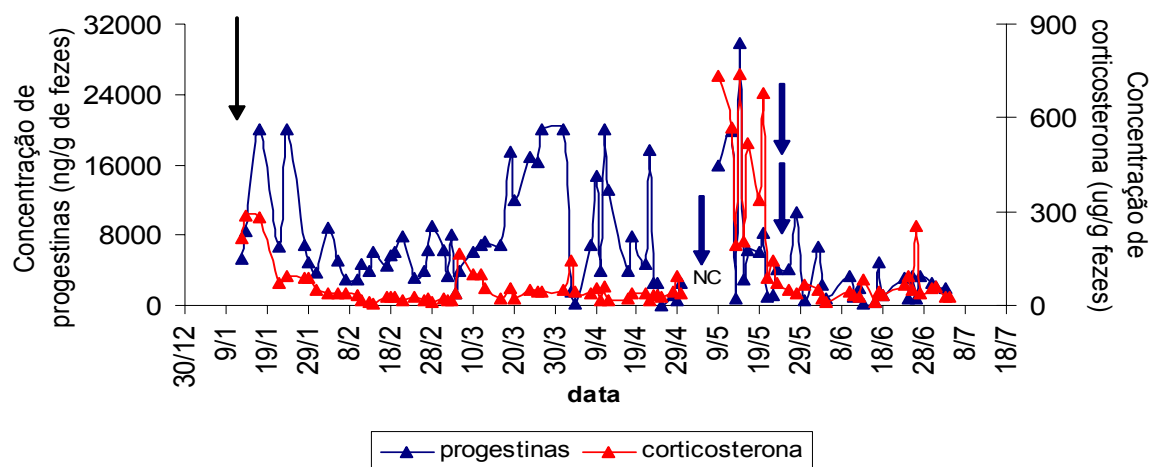


Figura 24 - Perfil de corticosterona e progesterona fecais da fêmea G6 de gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*) durante a lactação e após a retirada dos filhotes. A seta preta indica o parto. NC indica que não houve colheita no referido período. Cada seta azul indica a retirada de um filhote. São Paulo, 2004

Tabela 17 - Mediana das concentrações, valores mínimos e máximos de corticosterona fecal da fêmea G6 de gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*) na gestação, lactação e após a retirada dos filhotes. São Paulo, 2004

	Corticosterona (ug/g fezes)		
	mediana	mínimo	máximo
Gestação	-	-	-
Lactação (n=64)	41,72	6,76	737,45
Após retirada dos filhotes (n=22)	42,05*	11,03	252,74

\* $p > 0,05$  referente aos períodos de gestação e após a retirada dos filhotes.

“-“ apenas dois valores disponíveis para o período.

Quando os valores de cada fêmea foram analisados em conjunto, não foi observada diferença significativa entre gestação, lactação e após a retirada dos filhotes, e nem presença de correlação entre corticosterona e progesterona fecais no período total, nem nos eventos em separado.



## Discussão







## 5 DISCUSSÃO

Os valores obtidos nos ensaios de recuperação foram considerados satisfatórios, pois mostram que o método extrai com eficiência os hormônios adicionados e a variação entre os ensaios foi pequena. Valores mais altos de recuperação são descritos em outros trabalhos que utilizaram esta metodologia de extração, com valores acima de 90% para ambos os hormônios (BROWN, et al., 1994, 1996; MOREIRA et al., 2001), resultado que reflete a qualidade do laboratório onde foram desenvolvidos, laboratório esse que vêm trabalhando com a técnica há uma década. Viau (2003) encontrou  $80\pm 4,5\%$  e  $89\pm 6,09\%$  para estradiol e progesterona respectivamente. No entanto vale ressaltar que neste trabalho o hormônio marcado foi adicionado após a etapa de fervura, enquanto que no presente estudo foi adicionado diretamente nas fezes. Procedemos de forma diferente, por considerarmos que este monitoramento deve ser realizado desde a primeira etapa de extração.

Alguns laboratórios realizam a recuperação de cada amostra, outros a fazem apenas quando é empregada pela primeira vez em uma espécie ou fazem num único ensaio um lote de amostras aleatórias. O critério que foi adotado neste trabalho, de avaliar três amostras para cada hormônio em cada ensaio (FRENCH<sup>3</sup>, 2003, informação verbal), foi considerado o mais adequado dentro das condições em que foi desenvolvido o presente trabalho.

Foram utilizados hormônios marcados com diferentes DPM uma vez que vieram previamente diluídos dos Laboratórios que gentilmente os cederam, no volume necessário para a realização da avaliação.

Foi verificado paralelismo entre a curva padrão do conjunto diagnóstico e a curva obtida a partir de diluição seriada de *pool* de extratos fecais, para os metabólitos de estradiol e para as progestinas. Assim, ficou demonstrado matematicamente que não houve interferência

---

<sup>3</sup>Informação fornecida por French em São Paulo, 2003.

da matriz (extrato fecal) na ligação do antígeno (hormônio) com o seu anticorpo, validando o uso dos conjuntos diagnósticos da DPC (DIAGNOSTIC PRODUCTS CORPORATION, Los Angeles, CA, USA) para a quantificação de metabólitos de estradiol e progesterona em extratos fecais do gato-mourisco.

No caso dos ensaios de metabólitos de estradiol, a média dos coeficientes intra-ensaio baixo e o *pool* ficaram acima do considerado ideal para os parâmetros do laboratório (< que 10%). Em relação ao coeficiente intra-ensaio baixo, alguns ensaios apresentaram variação alta, sendo que nestes mesmos ensaios o coeficiente intra-alto e o *pool* não apresentaram problemas. Assim estes ensaios não foram descartados e seus resultados considerados sem ressalva. Dos 13 ensaios realizados, em 1 deles, o *pool* apresentou valor acima do usual, mas quando este mesmo pool foi utilizado nos ensaios de progestinas não apresentou alterações. Por isso acredita-se que pode ter havido algum problema no ensaio e não no pool. Como não havia verba para repeti-los, os resultados foram considerados com ressalvas. Neste ensaio foram quantificadas as amostras da fêmea G1 no período de 05/05/2003 a 29/07/03. Quando colocados junto aos outros dados desta fêmea não foi observada nenhuma alteração discrepante, como um valor extremamente alto, além do fato da duração do estro e do ciclo estral se mostrar condizente com a das outras fêmeas. Como trabalhamos com um número de animais e ciclos reduzidos, mesmo sem repetir as mensurações, não descartamos estes resultados.

Para os ensaios de progestinas todos os coeficientes ficaram a baixo de 10%, exceto o do *pool* que ficou ligeiramente acima com 10,73%, mas considerado bom.

Para os ensaios de corticosterona, todos os coeficientes foram considerados dentro do padrão de ensaios com duplo anticorpo, e inclusive se assemelharam ao encontrado por Brown et al. (1996).



A mediana da duração do ciclo estral de gato-mourisco encontrada no presente estudo foi de 24 dias (n=33 ciclos, variando de 6 a 82 dias). Em literatura, os dados de duração de ciclo para felídeos são expressos como  $média \pm EPM$ , no entanto, no nosso estudo este dado foi apresentado como mediana, por ser não-paramétrico. A duração encontrada para o estro foi de  $8,65 \pm 0,38$  dias (n=41 estros, variando de 5 a 14 dias). Ambos os valores diferem do citado em literatura por Mellen (1993) que verificou uma duração de ciclo de  $53,6 \pm 2,4$  dias (n=8) e do estro de  $3,2 \pm 0,8$  dias (n=6), utilizando-se apenas de observações comportamentais para compor estes valores.

O monitoramento fecal em felídeos da linhagem *Pantherinae* constatou em leopardo nebuloso (*Neofelis nebulosa*) ciclo estral com duração de  $24 \pm 2$  dias (n=35), variando de 14 a 43 dias, e estro de  $6 \pm 1$  dia (n=45), variando de 1 a 10 dias (BROWN et al., 1995); em tigre (*Panthera tigris*) ciclo estral de  $29,3 \pm 1,3$  dias, em leão (*Panthera leo*) de  $20,4 \pm 1,7$  dias, em leopardo das neves (*Panthera uncia*) de  $32,6 \pm 5,6$  dias, em guepardos (*Acinonyx jubatus*)  $23,8 \pm 3,7$  dias e em caracal (*Felis caracal*)  $23,8 \pm 3,7$  dias (GRAHAM et al., 1995); em guepardo ciclo estral de  $13,6 \pm 1,2$  dias (n=184) variando de 5 a 30 dias e estro com duração de  $4,1 \pm 0,8$  dias (n=132), variando 1 a 14 dias (BROWN et al., 1996); e em onça pintada (*Panthera onca*) ciclo estral de  $38,28 \pm 2,52$  dias (n=7), variando de 25 a 44 dias e estro  $10,42 \pm 1,15$  dias, variando de 7 a 15 dias (VIAU, 2003).

Monitoramento sérico de ciclo estral em felídeos selvagens mostrou em puma (*Puma concolor*) duração com variação de 17 a 25 dias (BONNEY et al., 1981), em leopardo das neves duração de 25,2 dias (SCHMIDT et al., 1993) e em leopardo (*Panthera pardus*) duração de 21 dias (EATON, 1977) e 23,8 dias (SCHMIDT et al., 1988).

Em trabalho realizado com três espécies de pequenos felídeos neotropicais a duração média  $\pm EPM$  do ciclo, considerando o intervalo entre dois picos de metabólitos fecais de estradiol, encontrada foi de:  $18,4 \pm 1,6$  dias (n=75, variação de 7-31 dias) para a jaguatirica

(*Leopardus pardalis*);  $16,7 \pm 1,3$  dias ( $n=23$ , variação de 11-27 dias) para o gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) e  $17,6 \pm 1,5$  dias ( $n=23$ , variação de 11-25 dias) para o gato-maracajá (*Leopardus wiedii*) (MOREIRA et al., 2001). Nenhuma das fêmeas ( $n=7$ ) do referido trabalho apresentou regularmente sinais comportamentais de receptividade. Apenas as jaguatiricas ( $n=2$ ) apresentaram, ocasionalmente (30%), comportamento indicativo de estro, como rolar, vocalizar e urinar em vários pontos, associado a aumento de metabólitos fecais de estradiol.

Graham et al. (2000), observaram que a duração média $\pm$ DP do ciclo estral em fêmeas de gato doméstico que não copularam, baseado nas concentrações de estrógenos fecais, foi de  $18,3 \pm 0,4$  dias ( $n=114$ , variação de 11 a 25 dias) e do estro  $6,3 \pm 0,3$  dias (variação de 3 a 10 dias). Esses dados corroboram com os obtidos em estudos onde se utilizaram as concentrações plasmáticas de estradiol como parâmetro, que encontraram ciclo variando de 14 a 21 dias (GOODDROWE, 1989) e estro de  $7,4 \pm 2,3$  dias (SHILLE et al., 1979). Comportamento de estro foi observado em apenas 67% das elevações de metabólitos fecais de estradiol.

Num outro trabalho com gato doméstico, de 14 fêmeas estudadas, 2 delas (14,3%) não exibiram comportamento de estro, sendo esta fase identificada apenas pela citologia vaginal (ROOT et al., 1995). Shille et al. (1979) e Wildt et al. (1978) observaram a ausência de estro comportamental em gato doméstico, em trabalhos onde foram verificados elevações cíclicas plasmáticas do estradiol e desenvolvimento folicular, indicativos de atividade ovariana

Como no presente estudo o comportamento não foi avaliado, não pudemos correlacioná-lo com os aumentos de metabólitos de estradiol nas fezes, e nem compará-los aos dados obtidos por Mellen (1993). No entanto os dados de Moreira et al. (2001), Graham et al. (2000), Root et al. (1995), Shille et al. (1979) e Wildt et al. (1978) já citados, nos permitem supor que durante o estudo do gato-mourisco, realizado por Mellen (1993) pode ter ocorrido atividade ovariana com conseqüente aumento nas concentrações de metabólitos de estradiol



nas fezes, sem que houvesse manifestação comportamental de estro. Isso justificaria o fato de ter sido encontrado naquele trabalho duração do ciclo estral maior do que a verificada no presente estudo.

Com base nestes valores, podemos observar que a duração do ciclo estral do gato-mourisco verificada neste estudo encontra-se mais próxima dos valores encontrados para os felídeos da linhagem *Pantherinae* do que dos outros pequenos felídeos neotropicais.

Como não foi realizado acompanhamento para verificação de estro comportamental, nem obtenção de dados por meio de citologia vaginal, ultrassonografia ou videolaparoscopia, consideramos que os picos de metabólitos de estradiol precedidos por elevação sempre estivessem associados a estro. No cálculo da duração do ciclo estral foram descartados os intervalos superiores a 106 dias, o dobro de dias da duração estimada do ciclo por Mellen (1993), sendo considerados como períodos de anestro. Assim, adotando este critério, o intervalo entre estros variou de 6 a 82 dias, ou seja, uma variação de 76 dias, bem maior do que a observada por Hulley (1976) em apenas uma fêmea de gato-mourisco, com intervalos de 6 a 51 dias, variação de 45 dias. E também bem superior à encontrada para outros felídeos (acima citados), onde a menor variação foi de 7 dias para o gato doméstico e a maior de 29 dias para o leopardo nebuloso. Vale ressaltar que 75% dos ciclos do presente estudo tiveram duração entre 6 e 45,5 dias, ou seja apenas 8 ciclos apresentaram duração superior a 45,5 dias. Como o observado no presente estudo, Booney, Moore e Jones (1981) encontraram em puma, e Brown et al. (1996) em guepardos, uma grande variação individual e entre os animais. Neste último trabalho os autores discutem que por terem ovulação induzida pela cópula, os felídeos possam apresentar uma sinalização hormonal para desencadear e finalizar o estro não tão fina quanto a das espécies de ovulação espontânea. Fato este, que permitiria uma maior variação na duração tanto do ciclo, como do estro dentro de um mesmo indivíduo e da espécie. Shille et al. (1979) verificaram que o intervalo entre ondas foliculares num grupo de fêmeas de gato



doméstico foi de  $8,1 \pm 3,1$  dias, variando entre 3 e 15 dias. Ou seja, o desenvolvimento folicular ocorre em intervalos irregulares e distintos entre os indivíduos.

Quanto à duração do estro, foi encontrada diferença em relação ao observado por Mellen (1993) para esta espécie, mas deve-se levar em consideração que naquele trabalho os dados foram oriundos de três fêmeas, enquanto que no presente estudo de oito, além do fato de que a manifestação comportamental do estro é desencadeada por altas concentrações de estrógeno sérico, o que não ocorre ao longo de todo o desenvolvimento folicular. Assim o monitoramento endócrino, seja invasivo ou não, é capaz de detectar elevações nas concentrações de estrógenos, indicando o início do estro, antes destas atingirem o limiar necessário para desencadear o comportamento de cio. Em gato doméstico, o início do cio ocorre geralmente de 1 a 3 dias após o início do crescimento folicular (SHILLE et al., 1979).

As medianas das concentrações para os valores basais e de pico para os metabólitos de estradiol para o gato-mourisco encontradas neste estudo foram de 4,67ng/g de fezes e 87,32ng/g de fezes, respectivamente, sendo que o maior valor basal foi menor que 26ng/g de fezes e o maior valor de pico menor que 360ng/g de fezes. As concentrações encontradas para grandes felídeos (guepardo, leopardo nebuloso e diversas espécies do gênero *Panthera*) são inferiores a 50ng/g de fezes secas para os valores basais e inferiores a 500ng/g de fezes secas para os valores de pico (BROWN et al., 2001). Já dentre os pequenos felídeos (jaguaritica, gato-do-mato-pequeno, gato-maracajá e gato-pescador) os valores encontrados são muito mais altos, com basal acima de 80ng/g de fezes secas e pico acima de 800ng/g de fezes secas (BROWN et al., 2001). Nossos resultados no que tange as concentrações destes metabólitos também se mostraram mais próximos ao dos grandes felídeos (linhagem *Pantherinae*), lembrando que trabalhamos com fezes úmidas, logo os valores absolutos são mais baixos.

Os cálculos para determinação das concentrações basais e de pico foram realizados para cada fêmea, uma vez que cada indivíduo pode apresentar um limiar diferente. Em



literatura encontramos que os valores basais são determinados por um processo matemático, onde os valores que excedem a média acrescida de 1,5DP são sucessivamente eliminados até que nenhum exceda este critério (BROWN et al., 1996; MOREIRA et al., 2001). Graham et al. (2000) baseou-se no mesmo processo, mas utilizando 2,0DP. Esses valores que restam são utilizados para compor a média dos valores basais e o mais alto deles é o limite entre basal e elevação. Utilizando este critério os valores considerados basais, os que sobraram, foram de número e valor muito reduzidos, o que não permitia uma diferenciação adequada entre o estro e o inter-estro. Na maioria das fêmeas a duração do estro era tão longa, que se ligava a um novo estro e assim os ciclos desapareciam, como se os animais estivessem constantemente no estro. Por isso foi adotado um outro critério, onde os valores que geraram o primeiro valor de pico foram comparados com os valores que geraram os picos subseqüentes e quando foi verificada diferença estatística entre estes valores (entre as suas medianas) determinou-se o limite entre basal e elevação.

A fêmea G4, que tinha 11 meses quando do início do projeto, foi avaliada em conjunto com as outras fêmeas, mesmo apresentando idade de animal pré-pubere, se considerarmos as citações em literatura (HULLEY, 1976; MELLEEN 1993), pois apresentou atividade ovariana desde o início do trabalho. Além disso, há relato de outra fêmea também nascida na instituição, que apresentou atividade ovariana, seguida de gestação, quando tinha 11,5 meses de idade (CASSARO<sup>4</sup>, 2003, informação verbal). Esse valor foi calculado retrospectivamente a partir da data do parto, considerando como 75 dias a duração da gestação (HULLEY, 1976).

Nas fêmeas que gestaram foi observado um aumento significativo dos metabólitos de estradiol no terço final da gestação (tabelas 4, 6 e 14), com pico 12 dias antes do parto na fêmea G2 e picos 15 e 21 dias antes do parto na Fêmea G5. Este aumento é esperado uma vez que o estradiol tem papel importante na mamogênese; na retenção de proteínas, cálcio e fósforo pelo organismo, para posterior utilização na lactação; na indução de formação e



---

<sup>4</sup> Informação fornecida por Cassaro em São Paulo, 2003

expressão dos receptores de ocitocina no útero para que ocorra o parto (LANGE et al., 2003) e na dilatação da cérvix (RAJABI et al., 1991). Em gatos domésticos um aumento sérico do estradiol também é verificado neste período, realizando pico 8 dias antes do parto (SCHMIDT et al., 1983). Em guepardo também se observa esta elevação (BROWN et al., 1996). Já em gato-leopardo (BROWN et al., 1994) e em gato-do-mato-pequeno (MOREIRA, 2001) as concentrações fecais se mostraram basais ao longo de toda a gestação. Sabe-se que em mulheres, primatas, vacas, éguas, cabras e ovelhas essa origem deste hormônio é placentária o que não ocorre em roedores e cadelas (RYAN, 1971). Em cadelas não foi encontrada aromatase na placenta, mas sua atividade foi verificada no corpo lúteo, onde ocorre um aumento no final da gestação do número de células que produzem essa enzima, revelando essa estrutura como a fonte de estrógenos neste período (NISHIYAMA et al., 1999). No entanto a origem dos andrógenos para a síntese do estradiol, ainda não foi estabelecida para os cães. Em humanos o estradiol placentário é sintetizado a partir do sulfato de dehidroepiandrosterona, que é oriundo em parte da circulação materna e em parte da circulação fetal (SIITERI; MACDONALD, 1966). A fonte de estradiol sérico em felídeos durante a gestação ainda é desconhecida.

O início da atividade ovariana foi verificado 65, 84 e 130 dias após o parto respectivamente nas gatas G2 (1 filhote), G5 (2 filhotes) e G6 (3 filhotes). Em gato-doméstico o número de filhotes influencia no tempo de retorno ao estro após o parto, devido a intensidade de estímulos de sucção diferente (TSUTSUI; STABENFELDT, 1993). Considerando o valor de 42 dias como desmame (HULLEY, 1976), nenhuma atividade ovariana foi observada anterior a este período. Assim, foi verificada nas três fêmeas aciclia lactacional, como também ocorre no gato doméstico (SCHMIDT et al., 1983) e como foi verificado em leopardo nebuloso por Brown et al. (1995). A fêmea G2 apresentou em 3 das suas 7 gestações, intervalo médio de 5 meses entre cópula e a primeira atividade ovariana pós





parto, ou seja, retornou a ciclar aproximadamente 75 dias depois do parto. Estes dados constam da ficha do animal na instituição e foram calculados retrospectivamente a partir das datas de parto. Quanto às fêmeas G5 e G6 a gestação verificada no presente estudo foi a segunda para ambas. Em gato doméstico o retorno a ciclicidade ocorre em média 60 dias após o parto (SCHMIDT et al., 1983).

Analisando a distribuição dos ciclos estrais das gatas em conjunto durante o período estudado, não foi verificada diferença estatística entre os meses. O histórico da instituição revela nascimentos ao longo de todo o ano. Com base no observado e no histórico dos animais, mesmo sem dados dos meses de outubro, novembro e dezembro (as colheitas terminaram no início de outubro), sugere-se que não há sazonalidade na espécie. No entanto seria necessário um estudo mais longo (de pelo menos 2 anos) para que esta consideração fosse confirmada. Os dados meteorológicos do período de colheita foram comparados com a distribuição dos estros ao longo dos meses. A única correlação encontrada foi em relação a temperatura máxima, mas foi uma correlação fraca.

Nas fêmeas não gestantes foi possível a observação de elevações das progesterinas, mas que não se sustentaram, apresentando característica oscilatória, não sendo possível estabelecer correlação com eventos biológicos. Algumas fêmeas, apresentaram elevações deste metabólito após pico de metabólitos de estradiol, mas estas elevações obedecem a padrões irregulares e inconsistentes, o que não nos permitiu concluir que essas elevações refletiram uma atividade luteínica, fato que caracterizaria uma ovulação espontânea.

Outros trabalhos realizados com felídeos selvagens (BROWN et al., 1994, 1995, 1996; GRAHAM et al., 2000; MOREIRA et al., 2001) utilizaram para detecção das progesterinas um anticorpo monoclonal, anti 4-pregnanen-11-ol-3,20-diona hemissuccinato:BSA, que reage 100% com progesterona, 96% com 5 $\alpha$ -pregnane-3 $\beta$ -ol-20-ona, 36% com 5 $\alpha$ -pregnane-3 $\alpha$ -ol-20-ona, 15% com 5 $\beta$ -pregnane-3 $\beta$ -ol-ona, 15% com 17 $\beta$ -hidroxiprogesterona, 13% com



pregnanolona, 7% com 5 $\beta$ -pregnane-3 $\alpha$ -ol-20-ona, 5% com 5 $\beta$ -pregnane-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -diol,20 $\alpha$ -one e menos que 1% com androstenediona, testosterona, estradiol, estriol e cortisol. Os principais metabólitos fecais de progesterona para este táxon foram determinados por HPLC (Cromatografia Líquida de alta precisão) por Brown et al. (1994). São eles: 5 $\beta$ -pregnane-3 $\beta$ -ol-ona (61,8%), 5 $\beta$ -pregnane-3 $\alpha$ -ol-20-ona (22,3%), 5 $\alpha$ -pregnane-3 $\alpha$ -ol-20-ona (13,9%) e 5 $\alpha$ -pregnane-3 $\beta$ -ol-20-ona (3,2%). O anticorpo utilizado nos trabalhos citados acima faz reações cruzadas importantes com todos eles. Já neste estudo, utilizamos um conjunto diagnóstico comercial que apresenta um anticorpo muito específico para a progesterona, que faz apenas um total de 12,4% de reação cruzada com seus metabólitos, sendo que não são significativas em relação aos metabólitos encontrados para felídeos. O anticorpo utilizado nos trabalhos acima citados não é disponível comercialmente, então se optou pelo uso do conjunto diagnóstico comercial, encontrado com facilidade no país.

Sendo assim, as progestinas detectadas no presente estudo podem não refletir os eventos biológicos séricos, e assim não podemos afirmar que ovulações espontâneas não tenham ocorrido.

Nas fêmeas gestantes, ao contrário do que se esperava, a concentração fecal de progestinas na gestação foi inferior a do período de lactação como pode ser observado na tabela 13. Em gato doméstico as concentrações de progesterona se elevam de dois a três dias após a cópula, atingido pico por volta de 25 a 30 dias de gestação, e então começa a cair gradativamente até o momento do parto (TSUITSUI; STABENFELDT, 1993). Em felídeos selvagens, as concentrações fecais de progestinas também se mostram elevadas ao longo da gestação, retornando ao basal apenas próximo ao parto. Em leopardo nebuloso e guepardo, Brown et al. (1995, 1996) verificaram que há um aumento de 25 e 100 vezes, respectivamente, na concentração de progestinas durante a gestação. Outros trabalhos com felídeos também encontraram altas concentrações destes metabólitos fecais durante a gestação

(BROWN et al., 1994; MOREIRA, 2001), indicando uma conservação deste mecanismo dentro do táxon. No entanto não podemos descartar a possibilidade de particularidades dentro de cada espécie no que tange a síntese e metabolização hormonal. Com relação às baixas concentrações verificadas na gestação no presente estudo, existe a possibilidade de haver a conversão da progesterona em outros hormônios ou metabólitos hormonais. Vale lembrar que na gestação temos a presença da placenta e do feto, ambos com participação na síntese e metabolização de hormônios esteróides. Schutzer e Holtan (1996) propuseram em éguas uma via alternativa onde a pregnenolona é convertida em metabólitos pela placenta, o que explica a ausência de progesterona e presença de seus metabólitos no sangue destas fêmeas na metade e final de gestação. Foi demonstrado *in vitro* a presença de enzimas que convertem pregnenolona em progesterona na placenta de gatas (MALASSINÉ; FERRÉ, 1979), mas não se sabe quais outras transformações ocorrem. Em primatas, *in vitro*, foi observada a conversão de androstenediona em estrona e  $17\beta$ -estradiol; pregnenolona em progesterona; e progesterona em seus metabólitos (AINSWORTH; RYAN, 1969). Quanto a atividade esteroideogênica fetal, há síntese de estradiol em equinos (LANGE et al., 2003) e suínos (FISCHER et al., 1985) e de andrógenos em humanos (MEINHARDT; MULLIS, 2002; SIITERI; MACDONALD, 1966). No entanto sabe-se que em humanos existe pouca ou nenhuma atividade da  $17\alpha$ -hidroxilase na placenta e assim não há conversão local de progestágenos em andrógenos (CASEY et al., 1992). Em relação aos felídeos, não existem estudos que comprovem quais conversões ocorrem e quais não ocorrem. Assim a possibilidade de que a progesterona sérica seja metabolizada na placenta não pode ser descartada.

Para verificar se esta hipótese tem consistência seria necessário submeter as amostras do período de gestação a um processo de separação como HPLC (Cromatografia líquida de alta precisão) ou GC-MS (Cromatografia gasosa associada a espectrofotometria de massa)



para que os esteróides fossem identificados. Vale salientar também, que das três fêmeas só obtivemos valores de primeiro terço de gestação da fêmea G2, e mesmo assim do final deste período, então não podemos afirmar que não houve aumento das progestinas fecais no início da gestação.

Em gato-doméstico a fonte de progesterona sérica na gestação é o corpo lúteo e a participação da placenta nesta síntese se restringe a uma atividade parácrina (VERSTEGEN et al., 1993). Sabe-se também que em gato doméstico a concentração de progesterona sérica pode se manter elevada até 63 dias pós-parto, caso a fêmea esteja lactando, devido a persistência do corpo lúteo (DAWSON, 1946 apud SCHMIDT et al., 1983). Isso poderia explicar as altas concentrações desses metabólitos que foram detectadas neste período, principalmente considerando-se o número de filhotes, uma vez que a fêmea que apresentou os maiores valores foi a G6, que gestou e amamentou 3 filhotes. Enquanto que a G5, gestou e amamentou 2 e a G2, pariu e amamentou apenas 1, tiveram valores mais baixos e semelhantes. Vale ressaltar que em exame ultrassonográfico foram evidenciadas duas vesículas na fêmea G2.

Uma outra possibilidade levantada para justificar altas concentrações de progestinas durante a lactação seria a conversão de hormônios esteróides da adrenal em metabólitos de progesterona no fígado e /ou no intestino. Segundo Winter e Bokkenheuser (1987), bactérias presentes na microbiota intestinal do gato doméstico são capazes de converter Cortisol em hydroxiandrostenediona-11 $\beta$  (*Eubacterium desmolans*) e Deoxicorticosterona em progesterona (*Eubacterium lentum*). Seria possível que as concentrações séricas de cortisol estivessem tão elevadas fazendo com que esta conversão refletisse num aumento de progestinas fecais. No entanto, a quantificação de corticosterona não evidenciou altas concentrações na lactação em relação aos outros períodos (tabelas 15, 16 e 17), e não foi encontrada correlação com as progestinas neste período.



Uma terceira possibilidade para justificar este aumento de progestinas na lactação seria a produção de progesterona pela adrenal, que refletiria num aumento de progestinas nas fezes. Após estímulo estressante ou estimulação com ACTH, já foi observado aumento de progesterona sérica em leas com implantes contraceptivos por Bertschinger et al. (2002), em fêmeas de cervo dama inteiras e ovariectomizadas por Asher et al. (1989) e em ratas castradas (ANSELMO-FRANCI<sup>5</sup>, 2003, informação verbal). Sendo que o trabalho de Bertschinger et al. (2002) também avaliaram as concentrações séricas de cortisol, que aumentaram de 10 a 45% após a aplicação de ACTH, enquanto que a progesterona aumentou de 4 a 10 vezes. Assim, podemos supor que as altas concentrações de progestinas, encontradas durante a lactação sejam de origem adrenal, mesmo não tendo sido encontrada correlação entre corticosterona e progestinas neste período, no presente estudo.

Como já discutido em relação às fêmeas que não gestaram, o anticorpo do conjunto utilizado pode não ter sido eficiente na evidenciação nas fezes, de eventos biológicos séricos envolvendo a progesterona. Esta é na realidade a hipótese que consideramos mais plausível, dada a alta especificidade do anticorpo do conjunto diagnóstico utilizado para progesterona. E sabemos, como já discutido anteriormente, que as reações cruzadas deste conjunto com os metabólitos de interesse são baixas ou inexistentes.

Não foi constatado aumento de corticosterona próximo ao momento do parto, nem quando das separações dos filhotes, ao contrário do verificado por Moreira (2001) em gato-mato-pequeno e gato-maracajá. Nenhuma das fêmeas gestantes do presente estudo era primípara e ficaram alojadas fora do setor de exposição, em local de pouca circulação de pessoas, fatos estes que podem ter contribuído para os resultados obtidos.

Em relação aos períodos de lactação, gestação e após a retirada dos filhotes, foram verificadas concentrações significativamente elevadas de corticosterona na gestação quando comparadas com a lactação na fêmea G5. Já na fêmea G2 não verificamos tal diferença. Vale



---

<sup>5</sup>Informação fornecida por Anselmo-Franci em São Paulo. 2003

ressaltar que se trata da segunda e sétima gestação respectivamente e que o componente “experiência materna” pode estar envolvido neste caso. Comparando os períodos de lactação e após a retirada dos filhotes, tanto a G5, como a G6 apresentaram concentrações mais altas na lactação do que após a retirada dos filhotes, mas apenas na G5 foram consideradas significativas (tabelas 16 e 17).

Infelizmente, durante as internações na Divisão de Veterinária, só foi possível a colheita das fezes da fêmea G6, que evidenciaram aumento nas concentrações de corticosterona, que também pode ser observado imediatamente após o seu retorno ao viveiro e após o primeiro retorno da fêmea G5. Isso nos mostra o quão estressante foi esta transferência para um local onde ficavam expostas a outras espécies (predadores e presas naturais), movimentação de pessoal e manipulação para limpeza e tratamento.

Como já discutido no item anterior, não encontramos correlação entre as concentrações de progestinas e corticosterona na gestação e lactação.



## Conclusões







## 6 CONCLUSÕES

- Foi possível extrair e quantificar os metabólitos fecais de estradiol, progesterona e cortisol em fêmeas de gato-mourisco.
- Foi possível monitorar a atividade ovariana do gato-mourisco em cativeiro por meio da extração e quantificação de metabólitos fecais de estradiol, e a determinação da duração do ciclo estral e do estro.
- Os dados obtidos sugerem que não ocorreram ovulações espontâneas.
- Não foi encontrada correlação entre os metabólitos de progesterona e cortisol nas fases de gestação, lactação e após a retirada dos filhotes.



## Referências





## REFERÊNCIAS

AINSWORTH, L.; RYAN, K. J. Steroid hormone transformations by endocrine organs from pregnant mammals V. The biosynthesis and metabolism of progesterone and estrogens by orangutan placental tissue in vitro. **Steroids**, v. 14, p. 301-314, 1969.

ALLEN, M. E.; OFTEDAL, O. T.; BAER, D. J. The feeding and nutrition of carnivores. In : KLEINMAN, D.; ALLEN, M.; THOMPSON, K.; LUMPKIN, S. **Wild mammals in captivity, principles and techniques** . Chicago: The University of Chicago Press, 1996. p. 139-146.

ASHER, G. W.; PETERSON, A. J.; DUGANZICH, D. Adrenal and ovarian sources of progesterone secretion in young female fallow deer, *Dama dama*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 85, p. 667-675, 1989.

BADINO, G. **Big cats of the world**. London: Orbis Publishing, 1975. 128 p.

BAMBERG, E.; MÖSTL, E.; PATZL, M.; KING, G. J. Pregnancy diagnosis by enzyme immunoassay of estrogens in feces from nondomestic species. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 22, p.73-77, 1991.

BERTSCHINGER, H. J.; TRIGG, T. E.; JÖCHLE, W.; HUMAN, A. Induction of contraception in some African wild carnivores by downregulation of LH and FSH secretion using the GnRH analogue deslorelin. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 60, p. 41-52, 2002. Suplemento.

BISBAL, F. J. Distribution and habitat association of the carnivore community in Venezuela. In: REDFORD, K.H., EISENBERG, J. F. **Advances in neotropical mammalogy**. Gainesville: Sathill Crane Press, 1989. p. 339-362.

BONNEY, R. C.; MOORE, H. D. M.; JONES, D. M. Plasma concentrations of oestradiol 17 $\beta$  and progesterone, and laparoscopic observations of the ovary in the puma (*Felis concolor*) during oestrus, pseudopregnancy and pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 63, p. 523-531, 1981.



- BREAZILE, J. E. Physiologic basis and consequences of distress in animals. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 191, p. 1212-1215, 1987.
- 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. 71-82, 2001. Suplemento.
- 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.; WIELEBNOWSKI, N.; GOODROWE, K. L.; GRAHAM, L. H.; WELLS, S.; HOWARD, J. G. Reproductive activity in captive female cheetahs (*Acinonyx jubatus*) assessed by faecal steroids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 106, p. 337-346, 1996.
- BROWN, J. L.; WILDT, D. E.; GRAHAM, L. H.; BYERS, A. P.; COLLINS, L.; BARRETT, S.; HOWARD, J. Natural versus chorionic gonadotropin-induced ovarian responses in the clouded leopard (*Neofelis nebulosa*) assessed by fecal steroid analysis. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 93-102, 1995.
- BROWN, J. L.; WASSER, S. K.; WILDT, D. E.; GRAHAM, L. H. Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured non-invasively in feces. **Biology of Reproduction**, v. 51, p. 776-786, 1994.
- BROWN, J. L.; WASSER, S. K.; HOWARD, J.; WELLS, S.; LANG, K.; COLLINS, L.; RAPHAEL, B.; SCHWARTZ, R.; EVANS, M.; HOYT, T.; WILDT, D. E.; GRAHAM, L. H. Development and utility of fecal progesterone analysis to assess reproductive status in felids. In: CONGRESS OF AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS, 1993. Proceedings...American Association of Zoo Veterinarians, 1993, p. 273-276.
- CABRERA, A. Catálogo de los mamíferos de América del Sur. **Revista Del Museo Argentino de Ciências Naturales, Ciências Zoológicas**, n. 4, p. 161-247, 1957.
- CARLSTEAD, K.; BROWN, J. L.; SEIDENSTICKER, J. Behavioral and adrenocortical responses to environmental changes in leopard cat (*Felis bengalensis*). **Zoo Biology**, v. 12, p. 321-331, 1993.
- CASEY, M. L.; MACDONALD, P. C., SIMPSON, E. R. Endocrinological changes of pregnancy. In: WILSON, J. D.; FOSTER, D. W. **Willian's textbook of endocrinology**. Saunders Company 8<sup>o</sup>ed, 1992. p.977-1005.



CELEC, P.; OSTATNIKOVA, D.; PUTZ, Z.; HODOSY, J.; BURSKY, P.; STÁRKA, L.; HAMPL, R.; KUDELA, M. Circatigintan cycle of salivary testosterone in human male. **Biological Rhythm Research**, v. 34, p. 305-315, 2003.

CITES- Conservation International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna. **Listed species database**. Disponível em: <<http://www.cites.org/eng/resources/species.html>>. Acesso em 01 mar. 2004.

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.

COLLIER, G. E.; O'BRIEN, S. J. A molecular phylogeny of the Felidae: immunological distance. **Evolution**, v. 39, p. 473-487, 1985.

COOK, C. Rapid noninvasive measurement of hormones in transdermal exudates and saliva. **Physiology and Behavior**, v. 75, p. 169-181, 2002.

CRAWSHAW, P. G. **Comparative ecology of ocelot (*Felis pardalis*) and jaguar (*Panthera onca*) in a protected subtropical forest in Brazil e Argentina**. 1995. 190f. Ph.D. dissertation, University of Florida, Gainesville, 1995.

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

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

DRESSER, B. L.; KRAMER, L.; REECE, B.; RUSSELL, P. T. Induction of ovulation and successful artificial insemination in a Persian leopard (*Panthera pardus saxicolor*). **Zoo Biology**, v. 1, p. 55-57, 1982.

DOBSON, H.; SMITH, R. F. Stress and reproduction in farm animals. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 49, p. 451-461, 1995. Suplemento.



DONOGHUE, A. M.; JOHNSTON, L. A.; SEAL, U. S.; ARMSTROG, D. L.; TILSON, R. L.; WOFF, P.; PETRINI, K.; SIMMONS, G.; GROSS, T.; WILDT, D. E. In vitro fertilization and embryo development in vitro and in vivo in the tiger. **Biology of Reproduction**, v.43, p. 733-744, 1990

EMMONS, L. H. **Neotropical rainforest mammals: a field guide**. Chicago: University of Chicago Press, 1990. 281 p.

EWER, R. F. **The carnivores**. New York: Cornell University Press, 1973. 494 p.

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

FISCHER, H. E.; BAZER, F. W.; FIELDS, M. J. Steroid metabolism by endometrial and conceptus tissue during early pregnancy and pseudopregnancy in gilts. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 75, p. 69-78, 1985.

FRENCH, J. A.; STRIBLEY, J. A. Patterns of urinary oestrogen excretion in female golden lion tamarins (*Leontopithecus rosalia*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v.75, p.537-546, 1985.

GOODROWE, K. L.; HOWARD, J.G.; SCHMIDT, P.M.; WILDT, D.E. Reproductive biology of the domestic cat with special reference to endocrinology, sperm function and in vitro fertilization. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 39, p. 73-90, 1989. Suplemento.

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

GRAHAM, L. H.; SWANSON, W. F.; BROWN, J. L. Chorionic gonadotropin administration in domestic cats causes an abnormal endocrine environment that disrupts oviductal embryo transport. **Theriogenology**, v.54, p. 1117-1131, 2000.

GRAHAM, L.H.; BROWN, J. L. Cortisol metabolism in the domestic cat and implications for non-invasive monitoring of adrenocortical function in endangered felids. **Zoo Biology**, v. 15, p. 71-82, 1996.



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

GRZIMEK, B. **Animal life encyclopedia**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1975. 675 p.

GROSS, T. S.; THARNISH, M. S.; RODDEN, M. Fecal steroid analyses as an assessment of reproductive unction in the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). CONGRESS OF AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS, 1991. Proceedings...American Association of Zoo Veterinarians, 1991, p. 387-389.

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.

GUGGISBERG, C. A. W. **Wild cats of the world**. New York: Taplinger, 1975. 323 p.

GUIMARÃES, M. A. B. V. **Ciclo ovariano do macaco prego (*Cebus paella*, LINNAEUS, 1758): técnicas de extração e dosagem de progestinas fecais e hormônio luteinizante urinário**. 1999. 63 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

HALL, E. R. **The mammals of the North America**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: John Wiley and Sons, 1981.

HALLIGAN, S. H.; HERBERT, J.; GOODYER, I. M.; MURRAY, L. Exposure to postnatal depression predicts elevated cortisol in adolescent offspring. **Biological Psychiatry**, v. 55 p. 376-81, 2004.

HEISTERMANN, M.; PRÖVE, E.; WOLTERS, H. J.; MIKA, G. Urinary oestrogen and progesterone excretion before and during pregnancy in a pied bare-face tamarin (*Saguinus bicolor bicolor*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 80, p. 635-640, 1987.

HELLING, H.; GATTEREAU, D.; LEFEBVRE, Y. Steroid metabolism from plasma cholesterol. I. Conversion of plasma cholesterol to placental progesterone in humans. **Clinics in Endocrinology and Metabolism**, v. 30, p. 624-631, 1970.

HOPSTER, H.; VAN DER WERF, J. T. N.; ERKENS, J. H. F.; BLOKHUIS, H. J. Effects of repeated jugular puncture on plasma cortisol concentration in loose-housed dairy cows. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 708-714, 1999.





HOWARD, J. G.; BARONE, M. A.; DONOGHUE, A. M.; WILDT, D. E. The effect of pre Ovulatory anaesthesia on ovulation in laparoscopically inseminated domestic cats. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 96, p. 175-186, 1992.

HOWARD, J. G.; DONOGHUE, A. M.; BARONE, M. A.; GOODROWE, K. L.; BLUMER, E. S.; SZODGRASS, K; STRNES, D.; TUCKER, M.; BUSH, M.; WILDT, D. E. Successful induction of ovarian activity and laparoscopic intrauterine artificial insemination in the cheetah (*Acinonyx jubatus*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 23, p. 288-300, 1992.

HULLEY, J. T. Maintenance and breeding of captive jaguarundis at Chester Zoo and Toronto. **International Zoo Yearbook**, v. 16, p. 120-122, 1976.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Lista nacional das espécies da fauna brasileira ameaçadas de extinção, maio 2003**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/sbf/fauna/index.cfm>>. Acesso em 01 mar. 2004.

IUCN - International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources. **Cat Specialist Group**. Disponível em: <<http://lynx.uio.no/catfolk/sp-accts.htm>>. Acesso em 01 mar. 2004.

KASMAN, L. H.; RAMSAY, E. C.; LASLEY, B. L. Urinary steroid evaluations to monitor ovarian function in exotic ungulates:III. Estrone sulfate and pregnanediol-3-glucuronide excretion in the Indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*). **Zoo Biology**, v. 5, p. 355-361, 1996.

KHAN, M. K.; ALTMANN, S. S.; YU, J. A matter of time: evaluating the storage of fecal samples for steroid analysis. **General and Comparative Endocrinology**, v. 128, p. 57-64, 2002.

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

JOHNSON, W. E; O'BRIEN, S. J. Phylogenetic reconstruction of the felidae using 16S rRNA and NADH-5 mitochondrial genes. **Journal of Molecular Evolution**, v. 44, p. 98-116, 1997.

JURK, M. H.; CZEKALA, N; M.; LINDBURG, D. G.; MILLARD, S. E. Fecal corticoid metabolite measurement in the cheetah (*Acinonyx jubatus*). **Zoo Biology**, v. 16, p. 133-147, 1997.



KONECNY, M. J. Movement patterns and food habits of four sympatric carnivore species in Belize, Central America. In: REDFORD, K. H., EISENBERG, J. F. **Advances in neotropical mammalogy**. Gainesville: Sadtill Crane Press, 1989. p. 243-264.

KOREN, L.; MOKADY, O.; KARASKOV, T.; KLEIN, J.; KOREN, G.; GEFFEN, E. A novel method using hair for determining hormonal levels in wildlife. **Animal Behaviour**, v. 63, p. 403-406, 2002.

LANGE, I. G.; HARTEL, A.; MEYER, H. H. D. Evolution os estrogen functions in vertebrates-A Review. **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 and Wildlife Medicine**, v. 22, p. 23-31, 1991.

LUTZ, C. K.; TIEFENBACHER, S.; JORGENSEN, M. J.; MEYER, J. S.; NOVAK, M. A. Techniques for collecting saliva from awake, unrestrained, adult monkeys for cortisol assay. **American Journal of Primatology**, v. 52, p. 93-99, 2000.

MALASSINÉ, A.; FERRÉ, F. Delta 5,3 beta hydroxysteroid dehydrogenase activity in cat placental labyrinth: evolution during pregnancy, subcellular distribution. **Biology of Reproduction**, v. 21, p. 965-971, 1979.

MANZANI, P. R.; MONTEIRO, F. Notes on the food habits of the jaguarundi, *Felis yagouaroundi*. **Mammalia**, v. 53, p. 659-660, 1989.

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

MEINHARDT, U.; MULLIS, P. E. The Aromatase cytochrome p-450 and its clinical impact. **Hormone Research**, v. 57, p. 145-152, 2002.

MEIRELLES, C. F. Controle reprodutivo em capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris hydrochaeris*, LINEU, 1766), através da determinação de progesterinas nas fezes. 1993. 48 f. Tese (Livro docência) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1993.



MELLEN, J. D. A comparative analysis of scent-marking, social and reproductive behavior in 20 species of small cats (*Felis*). **American Zoologist**, v. 33, p. 151-166, 1993.

MENDEL, M.; ZANELLA, J.; BROOM, D. M. Physiological and reproductive correlates of behavioral strategies in female domestic pigs. **Animal Behaviour**, v. 44, p.1107-1121, 1992.

MONDOLFI, E. Notes on the biology and status of the small wild cats in Venezuela. In: MILLER, S. D., EVEREST, D. D., **Cats of the world: biology, conservation and management**. Washington: National Wildlife Federation, 1986. p. 125-146.

MORAIS, R. N.; MUCCIOLO, R. G.; GOMES, M. L. F.; LACERDA, O.; MORAES, W.; MOREIRA, N.; SWANSON, W. F.; BROWN, J. L. Adrenal activity assessed by fecal corticoids and male reproductive traits in three south American felid species. In: CONGRESS OF AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS, 1997. Proceedings... American Association of Zoo Veterinarians, 1997, p. 220-223.

MORAIS, R. N.; MOREIRA, N.; MORAES, W.; MUCCIOLO, R. G.; LACERDA, O.; GOMES, M. L. F.; SWANSON, W. F.; GRAHAM, L. H.; BROWN, J. L. Testicular and ovarian in South American small felids assessed by fecal steroids. In: CONGRESS OF AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS, 1996. Proceedings... American Association of Zoo Veterinarians, 1996 p. 561-565.

MORATO, R. G. **Reprodução assistida como ferramenta auxiliar no manejo e conservação da onça-pintada (*Panthera onca*, LINNAEUS, 1758)**. 2001. 127 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

MOREIRA, N. **Reprodução e estresse em fêmeas de felídeos do gênero *Leopardus***. 2001. 231 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

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

MÖSTL, E.; PALME, R. Hormones as indicators of stress. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p. 67-74, 2002.



- NISHIYAMA, T.; TSUMAGARI, S.; ITO, M.; KIMURA, J.; WATANABE, G.; TAYA, K.; TAKEISHI, M. Immunohistochemical study of steroidogenic enzymes in the ovary and placenta during pregnancy in the dog. **Anatomy, Histology and Embryology**, v. 28, p. 125-129, 1999.
- O'BRIEN, S. J.; MARTENSON, J. S.; MITHTHAPALA, S.; JANCZEWSKI, D.; PECON-SLATTERY, J.; JOHNSON, W.; GILBERT, D. A.; ROELKE, M.; PACKER, C.; BUSH, M.; WILDT, D. E. Conservation genetics of the felidae. In: AVISE, J. C.; HAMRICK, J. L. **Conservation genetics: case histories from nature**, New York: Chapman & Hall, 1996. p. 51-74.
- OLIVEIRA, T. G. *Herpailurus yagouaroundi*. **Mammalian Species**, v. 578, p.1-6, 1998.
- OLIVEIRA, T. G.; CASSARO, K. **Guia de identificação dos felinos brasileiros**. São Paulo: Sociedade de Zoológicos do Brasil, Fundação Parque Zoológico de São Paulo, 1997. 60 p.
- OLIVEIRA, T. G., **Neotropical cats: ecology and conservation**. Maranhão: Edufma, 1994. 220 p.
- PALME, R.; HOLZMANN, A.; MITTERER, T. Measuring fecal estrogens for the diagnosis of cryptorchidism in horses. **Theriogenology**, v. 42, p. 1381-1387, 1994.
- PEREIRA, R. J. G. **Monitoramento da atividade reprodutiva anual dos machos de veado-campeiro (*Ozotocerus bezoarticus*) em cerrado do Brasil central**. 2002. 92 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.
- POPE, C. E.; JOHNSON, C. A.; MCRAE, M. A.; KELLER, G. L.; DRESSER, B. L. Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 53, p. 221-236, 1998.
- POPE, C. E.; GLEWICKS, E. J.; WACHS, K. B.; KELLER, G. L.; MARUSKA, E. J.; DRESSER, B. L. Successful interspecies transfer of embryos from the Indian desert cat (*Felis silvestris ornata*) to the domestic cat (*Felis catus*) following in vitro fertilization. **Biology of Reproduction**, v. 40, p. 61, 1989. Suplemento.
- RAJABI, M. R.; DODGE, G. R.; SOLOMON, S.; POOLE, A. R.. Immunochemical and immunohistochemical evidence of oestrogen-mediated collagenolysis as a mechanism of cervical delation in the guinea pig at parturition. **Endocrinology**, v. 128, p. 371-378, 1991.



RIBEIRO, E. A. A. **Uma análise da relação entre o comportamento reprodutivo e os níveis de progestinas fecais em um grupo silvestre de mico-leão-dourado (*Leontopithecus rosalia*)**. 1994. 174 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Geral) - Instituto de Ciências Biomédicas Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.

RILEY, V. Psychoneuroendocrine influences on immunocompetence and neoplasia. **Science**, v. 212, p. 1100-1109, 1981.

RYAN, K. J. Endocrine control of gestational length. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 109, p. 299-306, 1971.

ROOT, M. V.; JOHNSTON, S. D.; OLSON, P. N. Estrous length, pregnancy rate, gestation and parturition lengths, litter size and juvenile mortality in the domestic cat. **Journal of American Animal Hospital Association**, n. 31, p. 429-433, 1995.

SAFAR-HERMANN, N.; ISMAIL, M. N.; CHOI, H. S.; MOSTL, E.; BAMBERG, E. Pregnancy diagnosis in zoo animals by estrogen determination in feces. **Zoo Biology**, v. 6 p. 189-193, 1987.

SANDS, J.; CREEL, S. Social dominance, aggression and faecal glucocorticoid levels in a wild population of wolves, *Canis lupus*. **Animal Behaviour**, v. 67, p. 387-396, 2004.

SCHMIDT, A. M.; HESS, D. L.; SCHMIDT, M. J.; LEWIS, C. R. Serum concentrations of oestradiol and progesterone and frequency of sexual behaviour during the normal oestrous cycle in the snow leopard (*Panthera uncia*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, p. 91-95, 1993.

SCHMIDT, A. M.; CHAKRABORTY, P. K.; WILDT, D. E. Ovarian activity, circulating hormones and sexual behaviour in the cat. II. Relationships during pregnancy, parturition, lactation and postpartum estrus. **Biology of Reproduction**, v. 28, p. 657-671, 1983.

SCHUTZER, W. E.; HOLTAN, D. W. Steroid transformation in pregnant mares: Metabolism of exogenous progestins and unusual metabolic activity in vivo and in vitro. **Steroids**, v. 61, p. 94-99, 1996.

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



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

SHILLE, V. M.; HAGGERTY, M. A.; SHACKLETON, C.; LASLEY, B. L. Metabolites of estradiol in serum, bile, intestine and feces of the domestic cat (*Felis catus*). **Theriogenology**, v. 34, p. 779-794, 1990.

SHILLE, V. M.; WING, A. E.; LASLEY, B. L.; BANKS, J. A. Excretion of radiolabeled estradiol in the cat (*Felis catus*): A preliminary report. **Zoo Biology**, v. 3, p. 201-209, 1984.

SHILLE, V. M.; LUNDSTROM, K. E.; STABENFELDT, G. M. Follicular function in the domestic cat as determined by estradiol-17B concentrations in plasma: Relation to estrous behaviour and cornification of exfoliated vaginal epithelium. **Biology of Reproduction**, v. 21, p. 953-963, 1979.

SIITERI, P. K.; MACDONALD, P. C. Placental estrogen biosynthesis during human pregnancy. **Clinics in Endocrinology and Metabolism**, v. 26, p. 751-761, 1996.

SILVA, A. S.; MORATO, R. G.; SILVA, L. D. M. The potential for gamete recovery from non-domestic canids and felids. **Animal Reproduction Science**, v. 81, p. 159-175, 2004.

STILLWELL, H. J.; BROWN, J.; GRAHAM, L. H., Assessment of a commercially available radioimmunoassay for the detection of fecal cortisol metabolites in several non-domestic felid species. CONGRESS OF AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS, 1996 Proceedings... American Association of Zoo Veterinarians, 1996. p. 582-583.

SWANSON, W. F.; HOWARD, J. G.; ROOT, T. L.; BROWN, J. L.; ALVARADO, T.; BURTON, M.; STARNES, D.; WILDT, D. E. Responsiveness of ovaries to exogenous gonadotrophins and laparoscopic artificial insemination with frozen-thawed spermatozoa in ocelots (*Felis pardalis*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 106, p. 87-94, 1996.

SWANSON, W. F.; GRAHAM, K.; HOROHOV, D. W.; THOMPSON, D. L.; GODKE, R. A. Ancillary follicle and secondary corpora lutea formation following exogenous gonadotropin treatment in the domestic cat and effect of passive transfer of gonadotropin-neutralizing antisera. **Theriogenology**, v. 45, p. 661-572, 1996.

SWANSON, W. F.; HOROHOV, D. W.; GODKE, R. A. Production of exogenous gonadotrophin-neutralizing immunoglobulins in cats after repeated eCG-hCG treatment and relevance for assisted reproduction in felids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 105, p. 35-41, 1995.



TIBIRIÇÁ, L. C. **Dicionário guarani-português**. São Paulo: Traço Editora, 1989. 174 p.

TSUTSUI, T.; STABENFELDT, G. H. Biology of ovarian cycles, pregnancy and pseudopregnancy in the domestic cat. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 47, p. 29-35, 1993. Suplemento.

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

VERKERK, G. A.; PHIPPS, A. M.; CARRAGHER, J. F.; MATTHEWS, L. R.; STELWAGEN, K. Characterization of milk cortisol concentration as a measure of short-term stress responses in lactating dairy cows. **Animal Welfare**, v. 7, p. 77-86, 1998.

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

WALKER, E. P.; NOWAK, R. M. Felidae In: \_\_\_\_\_. **Walker's mammals of the world**. 2. ed. Baltimore, 1968.v.2, p.1268-1282.

WASSER, S. K.; PAPAGEORGE, S.; FOLEY, C.; BROWN, J. L. Excretory fate of estradiol and progesterone in the african elephant (*Loxodonta africana*) and patterns of fecal steroid concentrations throughout the estrous cycle. **General and Comparative Endocrinology**, v. 102, p. 255-262, 1996.

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

WASSER, S. K.; MONFORT, S. L.; WILDT, D. E. Rapid extraction of fecal steroids for measuring reproductive 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.; RISLER, L.; STEINER, R. A. Excreted steroids in primate feces over the menstrual cycle and pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 39, p. 862-872, 1988.



WILDT, D. E. Fertilization in cats. In: DUNBAR, B. S.; O'RAND, M. **A comparative overview of mammalian fertilization**. New York: Plenum Publishing, 1991. p. 299-328.

WILDT, D. E.; O'BRIEN, S. J.; HOWARD, J. G.; CARO, T. M.; ROELKE, M. E.; BROWN, J. L.; BUSH, M. Similarity in ejaculate-endocrine characteristics in captive versus free-ranging cheetahs of two subspecies. **Biology of reproduction**, v. 36, p. 351-360, 1987.

WILDT, D. E.; PLATZ, C. C.; CHAKRABORTY, P. K.; SEAGER, S. W. J. Oestrous and ovarian activity in a female jaguar (*Panthera onca*). **Journal of reproduction and Fertility**, v. 56, p. 555-558, 1979.

WILDT, D. E. ; GUTHRIE, S. C.; SEAGER, S. W. J. Ovarian and behavioral cyclicity of the laboratory maintained cat. **Hormonal Behaviour**, v. 10, p. 251-257, 1978.

WOZENCRAFT, W. C. Carnivora: Felidae: Felinae. In : WISON, D. E., REEDER, D. A. M. **Mammal species of the world: A taxonomic and geographic reference**. 2.ed. Washington D.C.: Smithsonian Institution Press, 1993. p. 288-298.

XIMENEZ, A. Notas sobre félidos neotropicales, V: nueva ampliación de la distribución del gato eira en Patagonia. **Comunicaciones Zoológicas del Museo de Historia Natural de Montevideo**, v. 135, p. 134-136., 1972.

ZIEGLER, T. E.; SHOLI, S. A.; SCHEFFLER, G.; HAGGERTY, M. A.; LASLEY, B. L. Excretion of estrone, estradiol and progesterone in the urine and feces of the female cotton-top tamarin (*Saguinus oedipus oedipus*). **American Journal of Primatology**, v. 17, p. 185-195, 1989.





## Anexos





## ANEXO A - Mapa da Distribuição



Figura 25 Distribuição geográfica do gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*):  
1- *H. y. armeghinoi*; 2- *H. y. cacomitli*; 3- *H. y. eyra*; 4- *H. y. fossata*;  
5- *H. y. melantho*; 6- *H. y. panamensis*; 7- *H. y. tolteca* e 8- *H. y. yagouaroundi* (OLIVEIRA, 1998).



ANEXO B - Piloto 1: Comparação entre a utilização de fezes liofilizadas e fezes úmidas no protocolo de extração descrito por Brown et al, 1993.

**Introdução:** O método citado vem sendo utilizado com sucesso em várias espécies de mamíferos (BROWN et al., 1995; MOREIRA et al., 2001, MORAIS et al., 2002; WASSER et al., 1994; WASSER; VELLOSO; RODDEN, 1995). A liofilização é a etapa inicial do protocolo, que por eliminar a água da amostra combate a atividade microbiana, permitindo armazenamento da amostra por mais tempo e torna as amostras mais homogêneas quanto ao teor de umidade. No entanto a utilização de fezes secas poderia ser um fator limitante para a realização deste protocolo na ausência de um liofilizador, aparelho de custo elevado e manutenção cara. Além do fator monetário, eliminando-se essa etapa o procedimento de extração torna-se mais rápido, uma vez que para fezes de felídeos o tempo estimado de secagem é de 12 horas. Moreira et al.(2001) e Moraes et al., (2002) utilizaram este protocolo com fezes úmidas sem comprometimento dos resultados.

**Objetivo:** Verificar e comparar a capacidade de extração do método descrito por Brown et al. em 1993 quando da utilização de amostra fecal úmida (*in natura*) e fezes liofilizadas, e avaliar a variação da porcentagem de umidade nas amostras.

**Material e métodos:** As 16 amostras foram extraídas e dosadas no Laboratório de Dosagens Hormonais da FMVZ/USP-SP, segundo o protocolo abaixo descrito (protocolo A) e o protocolo modificado (protocolo B). Protocolo A: a uma alíquota de 0,2g da amostra seca (previamente liofilizada) foram adicionados 5 ml de etanol 90%. Após homogeneização em aparelho vortex por 1 minuto, as amostras foram fervidas por 25 minutos a 80°C. Foram então centrifugadas por 15 minutos a 500G e o sobrenadante recuperado. O *pellet* foi ressuspensionado em 5 ml de etanol 90%, homogeneizado em aparelho vortex por 1 minuto e recentrifugado. Os dois sobrenadantes foram combinados, secos completamente, e então ressuspensionados em 1 ml de metanol. Os extratos foram homogeneizados por 1 minuto, colocados em cuba



limpadora ultrassônica por 15 minutos e encaminhados para dosagem por radioimunoensaio. Para tanto foi adicionada à amostra uma solução tampão de PBS + gelatina 0,1mol. Protocolo B: a única alteração consistiu na adição de 0,2g de fezes úmidas ao etanol 90% ao invés de fezes secas. Os perfis encontrados foram comparados pelo teste de correlação linear de Pearson (para os dados paramétricos) e de Spearman (para os dados não paramétricos).

**Resultados:** A porcentagem média de umidade encontrada nas amostras foi igual a 27,5%, variando de 20% a 36%. Os perfis obtidos para os metabólitos de estradiol na figura 26 e os perfis encontrados para os metabólitos de progesterona na figura 27. Considerando os metabólitos de estradiol a correlação entre os perfis encontrados foi igual a 0,95( $p < 0,0001$ ). Já para os de progesterona a correlação encontrada foi de 0,45, não significativa ( $p = 0,074$ ).

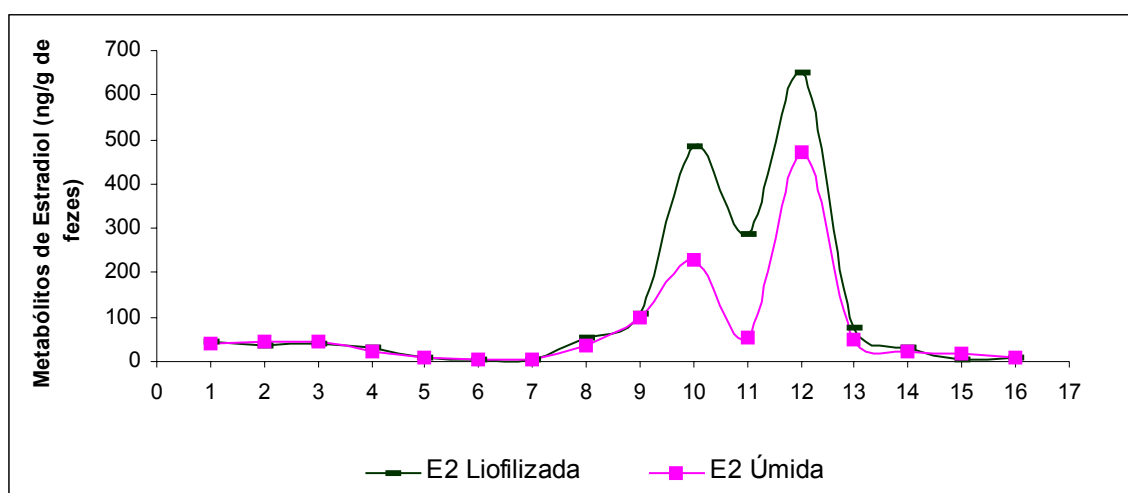


Figura 26 - Perfis de metabólitos de estradiol e de fêmeas de gato-mourisco obtidos a partir da utilização de amostras liofilizadas e amostras úmidas.



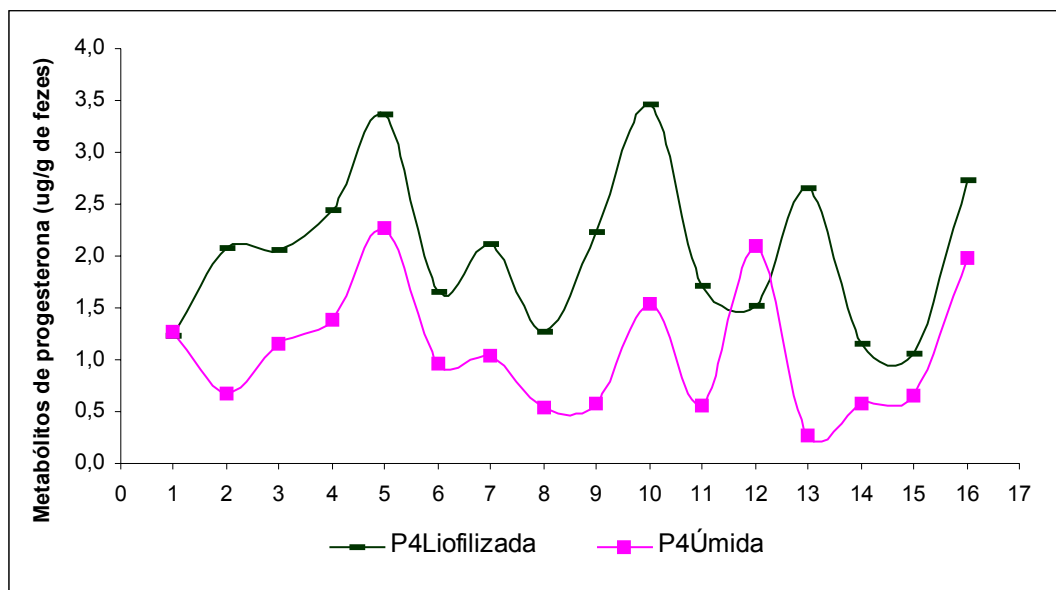


Figura 27 - Perfis de progesterona de fêmeas de gato-mourisco obtidos a partir da utilização de amostras liofilizadas e amostras úmidas.

**Discussão e Conclusão:** As concentrações encontradas para as progesterinas foram consideradas basais quando comparadas às citadas em literatura para outras espécies de pequenos felinos brasileiros (MOREIRA, 2001), enquanto que para os metabólitos de estradiol verificou-se um pico que foi coincidente nas duas metodologias de extração. Foi considerado pico o valor que excedeu a média dos valores basais acrescida de dois desvios-padrão. Tratando-se do estradiol as duas metodologias mostraram-se eficientes, com alta correlação. Já para a progesterona, a correlação encontrada foi baixa, sendo que no método com utilização de fezes liofilizadas os valores obtidos foram mais altos. O fato de não ter havido pico e de as concentrações terem oscilado em valores basais justificam esse resultado. Para ambos os metabólitos os valores de correlação entre amostras úmidas e secas vão de encontro com o observado por Moreira (2001) em gato-do-mato-pequeno, jaguatirica e gato-maracajá (estrógenos: 0,78, 0,71 e 0,81 respectivamente e progesterinas 0,43, 0,52, 0,68, respectivamente. Sendo assim, a fim de simplificar a metodologia, reduzindo o tempo e os custos, no entanto sem perder a confiabilidade dos resultados obtidos, optou-se pela utilização de amostras úmidas, como havia sido proposto inicialmente no projeto.



ANEXO C - Possível variação na concentração de metabólitos fecais quando armazenados em metanol ao longo do tempo.

**Introdução:** Segundo Khan, et al., em 2002 o contato da amostra extraída com o solvente orgânico poderia promover ao longo do tempo quebra de conjugados e oxidação de metabólitos, promovendo um aumento na concentração dos metabólitos na amostra. Como as quantificações por radioimunoensaio neste projeto não foram realizadas a cada extração, mas sim em apenas duas baterias de ensaios, no dia da dosagem tínhamos amostras armazenadas ressuspensas em metanol por 1 dia e por 90 dias. Por segurança, optou-se por guardar as amostras secas, só realizando a ressuspensão na data da dosagem.

**Objetivos:** Verificar se ocorre alteração na concentração dos metabólitos de estradiol e progesterona, quantificados por radioimunoensaio, de uma mesma amostra ao longo do tempo. E verificar se o armazenamento da amostra seca promove alguma alteração nos valores de dosagem.

**Materiais e métodos:** A partir de um pool de amostras de fezes *in natura*, realizou-se o procedimento de extração e esta amostra foi quantificada em diferentes datas (teste 1). Deste mesmo pool, 7 frações de 0,2g foram encaminhadas para extração e ressuspensas em diferentes datas. Eram quantificadas no dia da ressuspensão (teste 2).

**Resultados:** O coeficientes de variação encontrados no teste 1 foram de 23% para progestinas e 17% para os metabólitos de estradiol. No teste 2 os coeficientes encontrados foram: 16% para progestinas e 11% para os metabólitos de estradiol.

**Discussão e Conclusão:** Com base nos dados obtidos houve variações nas concentrações das progestinas e dos de metabólitos de estradiol. Este piloto serve apenas como um indício desta variação indicada por Khan et al.(2002), uma vez que foi realizado com um único *pool* de fezes num período curto de tempo, sem dados suficientes para uma avaliação estatística.

## REFERÊNCIAS

- BROWN, J. L.; WILDT, D. E.; GRAHAM, L. H.; BYERS, A. P.; COLLINS, L.; BARRETT, S.; HOWARD, J. Natural versus chorionic gonadotropin-induced ovarian responses in the clouded leopard (*Neofelis nebulosa*) assessed by fecal steroid analysis. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 93-102, 1995.
- KHAN, M. K.; ALTMANN, S. S. e YU, J. A matter of time: evaluating the storage of fecal samples for steroid analysis. **General and Comparative Endocrinology**, v. 128, p. 57-64, 2002.
- MORAIS, R. N.; MUCCILOLO, R.G.; GOMES, M. L. F.; LACERDA, O.; MORAES, W.; MOREIRA, N.; GRAHAM, L. H.; SWANSON, W. F.; BROWN, J. L. Seasonal analysis of semen characteristics, serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. wiedii*) and tigrina (*L. tigrinus*). **Theriogenology**, v. 57, p. 2027-2041, 2002.
- MOREIRA, N.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A.; MORAES, W.; SWANSON, W. F.; GRAHAM, L. H.; PASQUALI, L.; GOMES, M. L. F.; MORAIS, R. N.; WILDT, D. E. BROWN, J. L. Reproductive steroid hormones and ovarian activity in felids of the leopardus genes. **Zoo Biology**, v. 20, p. 103-116, 2001.
- MOREIRA, N. **Reprodução e estresse em fêmeas de felídeos do gênero Leopardus**. 2001. 231 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.
- WASSER, S. K.; MONFORT, S. L.; SOUTHERS, J.; WILDT, D. E. Excretion rates 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.; VELLOSO, A. L.; RODDEN, M. D. Using fecal steroids to evaluate reproductive function in female maned wolves. **Journal of Wildlife and Management**, v. 59, p. 889-894, 1995.

