Eduardo Antunes Dias

Avaliação do perfil de progestinas e metabólitos de
glicocorticóides em fezes de jaguatiricas (*Leopardus
pardalis*) submetidas ao desafio com ACTH

São Paulo

2006

EDUARDO ANTUNES DIAS

**Avaliação do perfil de progestinas e metabólitos de
glicocorticóides em fezes de jaguatiricas (*Leopardus pardalis*)
submetidas ao desafio com ACTH**

Tese 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 Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:
Reprodução Animal

Área de Concentração:
Reprodução Animal

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

São Paulo

2006

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

Elzer
BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'APICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
6/3/06

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1631 Dias, Eduardo Antunes
FMVZ Avaliação do perfil de progestinas e metabólitos de
glicocorticóides em fezes de jaguatiricas (*Leopardus pardalis*)
submetidas ao desafio com ACTH / Eduardo Antunes Dias. – São
Paulo : E. A. Dias, 2006.
72 f. : il.

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

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

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

1. Estresse. 2. Jaguatirica. 3. *Leopardus pardalis*. 4. Cortisol
fecal. 5. Progestinas. I. Título.

Processo IBAMA 02027.000740/2005-96

Interessado: Eduardo Antunes

Dias

Cgc/cpf/matr:

Telefone:

Endereço:

Bairro:

Cep:

Município:

Tipo Interessado: Pessoa

Física

Resumo Assunto: Solicita Licença para Coleta
Em Especime Mais..

Assunto: Licença Captura de Animais

Data Protocolo: 12-04-2005 09:09:53

Documento Original: São Paulo/sp

Seq	Destino	Tipo Destino	Data	Tipo Movimento	Despacho
7	Cenap	Ibama	09-08-2005 11:32:09	Saida Externa	Para Prosseguimento.
6	Spo/fauna	Ibama	23-06-2005 16:40:38	Andamento	A/c de Rossana para Prosseguimento.
5	Spo/fauna	Ibama	23-06-2005 14:15:48	Andamento	
4	Spo/coad	Ibama	23-06-2005 14:14:17	Andamento	Mov.rec.a Pedido de Marcio
3	Cenap	Ibama	19-05-2005 10:03:00	Saida Externa	Para Providências Cabíveis.
2	Spo/fauna	Ibama	12-04-2005 14:52:17	Andamento	Para Prosseguimento
1	Spo/fauna	Ibama	12-04-2005 09:09:53	Entrada

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

Comissão de Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação do perfil de progestinas e de metabólitos fecais de glicocorticóides em jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) submetidas a protocolos de superovulação e ao desafio com ACTH", protocolo nº658/2005, utilizando 05 jaguatiricas, 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 "ad referendum".

(We certify that the Research "Noninvasive monitoring of adrenocortical activity by fecal glucocorticoid and progestin's analyses in ocelots (*Leopardus pardalis*) submitted to ACTH challenge and superovulation protocols", protocol number 658/2005, utilizing 05 ocelots, 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 "ad referendum", meeting).

São Paulo, 01 de junho de 2005

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

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: DIAS, Eduardo Antunes

Título: Avaliação do perfil de progestinas e metabólitos de glicocorticóides em fezes de jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) submetidas ao desafio com ACTH

Tese 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 Doutor em Medicina Veterinária

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

À Jussara, à Coto, à Ilha, ao Pig e ao Foz o meu profundo agradecimento pela contribuição ímpar. Muito obrigado!

Aos meus pais João Carlos e Lisá, aos meus irmãos Rafael, Fernando e Eugênia e à minha vó Iracema por todo apoio prestado neste lugar tão distante da querida família de Pelotas.

À todos os amigos paulistas e em especial a Dona Celi e ao Sr. José Maria, que juntos tornaram a minha permanência em São Paulo tão hospitaleira quanto estar no Rio Grande do Sul.

Ao meu grande amigo e parceiro de todas as horas Marcílio Nichi, pelos conselhos e pela análise estatística.

Ao meu grande amigo Jean Carlo Silva pelo seu fundamental apoio na minha chegada a São Paulo e à USP.

Ao André Rocha, grande incentivador na minha chegada ao VRA.

À competente equipe do LDH, e dentre eles à Érika Felipe, pelo apoio técnico e científico.

À equipe do “Center for Conservation and Research of Endangered Wildlife (CREW)” do “Cincinnati Zoo & Botanical Garden” e em especial à Helen Bateman pelas mensurações das progesterinas, andrógenos e estrógenos.

À Associação Mata Ciliar e em especial à Cristina Adania, ao Cláudio da Silva e à Maíra pelo apoio logístico na execução da pesquisa e na colheita das amostras.

Ao acadêmico em medicina veterinária pela Universidade Federal de Pernambuco, Daniel Barreto de Siqueira, peça crucial na colheita das amostras.

Ao Ricardo Pinho Gomes Lopes pela bela foto da capa.

Ao grande mestre Dr. Renato Campanarut Barnabe.

Ao meu sábio orientador e grande amigo Prof. Dr. Marcelo Guimarães.

À todos colegas e amigos do VRA.

E finalmente a todos que tornaram possível a conclusão de mais este trabalho em pro
daconservação das espécies da fauna brasileira ameaçadas de extinção.

RESUMO

DIAS, E. A. Avaliação do perfil de progestinas e metabólitos de glicocorticóides em fezes de jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) submetidas ao desafio com ACTH. [Noninvasive assessment of adrenocortical activity by fecal glucocorticoids and progestins analysis in ocelots (*Leopardus pardalis*) submitted to ACTH challenge]. 2006. 72f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Dois conjuntos comerciais, o “ImmuChem Doubly Antibody Corticosterona ¹²⁵I RIE” da ICN “Biomedicals” e o “Coat-a-count Cortisol ¹²⁵I RIE” da DPC foram utilizados na mensuração dos metabólitos de glicocorticóides de fezes de jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) desafiadas com ACTH com o objetivo de comparar os resultados obtidos por cada um dos conjuntos. Paralelamente foram mensuradas as progestinas dos animais desafiados visando detectar fontes extra-gonadais de progesterona. Dois tipos de extração de metabólitos fecais também foram testados. O conjunto comercial da ICN provou ser mais confiável na detecção de metabólitos fecais de glicocorticóides. As duas técnicas de extração obtiveram resultados semelhantes, demonstrando ser indiferente a escolha da técnica para a extração de metabólitos de glicocorticóides em fezes de jaguatirica. Existem fortes indícios da produção de progesterona pela adrenal de jaguatiricas submetidas ao desafio com ACTH.

Palavras-chave: Estresse. Jaguatirica. *Leopardus pardalis*. Cortisol Fecal. Progestinas.

ABSTRACT

DIAS, E. A. **Noninvasive assessment of adrenocortical activity by fecal glucocorticoids and progestins analysis in ocelots (*Leopardus pardalis*) submitted to ACTH challenge** [Avaliação do perfil de progestinas e metabólitos de glicocorticóides em fezes de jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) submetidas ao desafio com ACTH]. 2006. 72f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Two commercial kits, the ImmuChem Doubly Antibody Corticosterona ^{125}I RIE from ICN Biomedicals and Coat-a-count Cortisol ^{125}I RIE from DPC were used on fecal glucocorticoids measurement of ocelots (*Leopardus pardalis*) submitted to ACTH challenge aiming to compare the performance of both kits. In another way progestins from the same animals submitted to ACTH challenge were measured aiming to find progesterone from extra gonadal sources. Two different fecal metabolites extraction protocols were tested as well. The ICN commercial kit had better results on glucocorticoids metabolites measurement. Both extraction protocols had similar performance and this data indicates that any both can be used for this purpose. There are strong evidences of adrenal secretion of progesterone after ACTH challenge.

Key words: Stress. Ocelot. *Leopardus pardalis*. Fecal Cortisol. Progestins.

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1- Número do registro, número do “studbook” e a idade dos animais utilizados no experimento.....	29
QUADRO 2 - Cronograma do experimento Desafio com ACTH realizado em jaguatiricas na Associação Mata Ciliar, Jundiaí/SP – set. 2004.....	31

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Média e erro padrão dos valores dos glicocorticóides extraídos de fezes da jaguatirica Cotó segundo as técnicas de Wasser et al. (1994) e de Schwarzenberger et al. (1991) e mensurado por meio do conjunto comercial da DPC - radioimunoensaio no Laboratório de Dosagens Hormonais – Departamento de Reprodução Animal da FMVZ/USP, São Paulo/SP - agosto de 2003.....	39
TABELA 2 -Médias, erros padrões e nível de significância dos valores dos glicocorticóides fecais das jaguatiricas Pig, Ilha e Jussara submetidas ao desafio com ACTH. Extração segundo a técnica modificada de Schwarzenberger et al. (1991) e mensurado por meio dos conjuntos comerciais da ICN e DPC- radioimunoensaio no Laboratório de Dosagens Hormonais – Departamento de Reprodução Animal da FMVZ/USP, São Paulo/SP - outubro de 2004. TABELA 2 – Médias, erros padrões e nível de significância dos valores dos glicocorticóides fecais das jaguatiricas Pig, Ilha e Jussara submetidas ao desafio com ACTH. Extração segundo a técnica modificada de Schwarzenberger et al. (1991) e mensurado por meio dos conjuntos comerciais da ICN e DPC- radioimunoensaio no Laboratório de Dosagens Hormonais – Departamento de Reprodução Animal da FMVZ/USP, São Paulo/SP - outubro de 2004.....	46

LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1 - Perfil de glicocorticóides extraídos de fezes da jaguatirica Cotó segundo as técnicas de Wasser et al. (1994) e de Schwarzenberger et al. (1991) e mensurado por meio do conjunto comercial da DPC - radioimunoensaio no Laboratório de Dosagens Hormonais – Departamento de Reprodução Animal da FMVZ/USP, São Paulo/SP - agosto de 2003.....40
- GRÁFICO 2 - Perfil de glicocorticóides fecais da jaguatirica Foz submetida ao Desafio com ACTH. Extração segundo a técnica modificada de Schwarzenberger et al. (1991) e mensurado por meio dos conjuntos comerciais da ICN e DPC- radioimunoensaio no Laboratório de Dosagens Hormonais – Departamento de Reprodução Animal da FMVZ/USP, São Paulo/SP - outubro de 2004.....41
- GRÁFICO 3 - Perfil de glicocorticóides fecais da jaguatirica Jussara submetida ao Desafio com ACTH. Extração segundo a técnica modificada de Schwarzenberger et al. (1991) e mensurado por meio dos conjuntos comerciais da ICN e DPC- radioimunoensaio no Laboratório de Dosagens Hormonais – Departamento de Reprodução Animal da FMVZ/USP, São Paulo/SP - outubro de 2004.....42
- GRÁFICO 4 - Perfil de glicocorticóides fecais da jaguatirica Ilha submetida ao Desafio com ACTH. Extração segundo a técnica modificada de Schwarzenberger et al. (1991) e mensurado por meio dos conjuntos comerciais da ICN e DPC- radioimunoensaio no Laboratório de Dosagens Hormonais – Departamento de Reprodução Animal da FMVZ/USP, São Paulo/SP - outubro de 2004.....43
- GRÁFICO 5 - Perfil de glicocorticóides fecais da jaguatirica Pig (controle negativo) submetida ao Desafio com ACTH. Extração segundo a técnica modificada de Schwarzenberger et al. (1991) e mensurado por meio dos conjuntos comerciais da ICN e DPC- radioimunoensaio no Laboratório de Dosagens Hormonais – Departamento de Reprodução Animal da FMVZ/USP, São Paulo/SP - outubro de 2004.....44
- GRÁFICO 6 – Médias, erros padrões e nível de significância dos valores dos glicocorticóides fecais das jaguatiricas Pig, Ilha e Jussara submetidas ao desafio com ACTH. Extração segundo a técnica modificada de

Schwarzenberger et al. (1991) e mensurado por meio dos conjuntos comerciais da ICN e DPC- radioimunoensaio no Laboratório de Dosagens Hormonais – Departamento de Reprodução Animal da FMVZ/USP, São Paulo/SP - outubro de 2004.....45

GRÁFICO 7 - Perfil de progestinas, estrógenos e andrógenos fecais da jaguatirica Foz submetida ao Desafio com ACTH. Extração segundo a técnica modificada de Schwarzenberger et al. (1991) e mensurados com os anticorpos CL425, R4972 e R156/7- enzimaímunoensaio no “Center for Conservation and Research of Endangered Wildlife (CREW) do Cincinnati Zoo & Botanical Garden”, Cincinnati/Ohio - fevereiro de 2005.....48

GRÁFICO 8 - Perfil de progestinas, estrógenos e andrógenos fecais da jaguatirica Jussara submetida ao Desafio com ACTH. Extração segundo a técnica modificada de Schwarzenberger et al. (1991) e mensurados com os anticorpos CL425, R4972 e R156/7- enzimaímunoensaio no “Center for Conservation and Research of Endangered Wildlife (CREW) do Cincinnati Zoo & Botanical Garden”, Cincinnati/Ohio - fevereiro de 2005.....49

GRÁFICO 9 - Perfil de progestinas, estrógenos e andrógenos fecais da jaguatirica Ilha submetida ao Desafio com ACTH. Extração segundo a técnica modificada de Schwarzenberger et al. (1991) e mensurados com os anticorpos CL425, R4972 e R156/7- enzimaímunoensaio no “Center for Conservation and Research of Endangered Wildlife (CREW) do Cincinnati Zoo & Botanical Garden”, Cincinnati/Ohio - fevereiro de 2005.....50

GRÁFICO 10 - Perfil de progestinas, estrógenos e andrógenos fecais da jaguatirica Pig (controle negativo) submetida ao Desafio com ACTH. Extração segundo a técnica modificada de Schwarzenberger et al. (1991) e mensurados com os anticorpos CL425, R4972 e R156/7- enzimaímunoensaio no “Center for Conservation and Research of Endangered Wildlife (CREW) do Cincinnati Zoo & Botanical Garden”, Cincinnati/Ohio - fevereiro de 2005.....51

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Jaguatirica (<i>Leopardus pardalis</i>).....	21
FIGURA 2 – Vista dos recintos das jaguatiricas na Associação Mata Ciliar, Jundiaí/ SP – set. 2004.....	30
FIGURA 3 – Contenção física das jaguatiricas em caixa de prensa realizada na Associação Mata Ciliar em Jundiaí/ SP – set. 2004.....	31

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	Objetivos.....	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	<i>Leopardus pardalis</i>.....	21
2.2	Técnicas de apoio à conservação.....	22
2.3	Estudo da fisiologia reprodutiva.....	22
2.4	Mecanismos do estresse e o seu monitoramento.....	23
2.5	Utilização de conjuntos comerciais na mensuração de metabólitos hormonais.....	26
2.6	Progesterona e outros hormônios esteróides extra-gonadais.....	27
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1	Área e unidade de estudo.....	29
3.2	Delineamento Experimental.....	30
3.3	Conservação e processamento das amostras.....	32
3.4	Taxas de sensibilidade e razão cruzada dos conjuntos comerciais e dos anticorpos.....	34
3.5	Análise estatística.....	35
4	RESULTADOS.....	38
4.1	Protocolos de extração.....	38
4.2	Desafio com ACTH.....	40
4.2.1	Análise estatística.....	44
4.3	Progestinas, estrógenos e andrógenos.....	47
4.3.1	Análise Estatística.....	52
5	DISCUSSÃO.....	54
5.1	Protocolos de extração.....	54

5.2	Desafio com ACTH.....	55
5.3	Progestinas, andrógenos e estrógenos.....	57
6	CONCLUSÕES.....	62
7	REFERÊNCIAS.....	64
8	ANEXO A.....	69

1 INTRODUÇÃO

Os números de espécimes de animais selvagens em cativeiro vêm aumentando drasticamente ao longo das décadas em consequência da crescente interferência humana nos mais diversos ecossistemas do planeta, ocorrendo com maior frequência em países em desenvolvimento que ainda possuem vastas áreas intocadas. Como os recursos para a área ambiental são escassos devido à falta de políticas públicas claras e devido à priorização das causas sócio-econômicas, esse fato gera um problema: o que fazer com os animais provenientes da natureza? Alternativas como a colocação em zoológicos e criadouros tem sido insuficientes para resolver a questão em função dos altos custos de manutenção. Por um outro lado, a cada dia que passa formamos uma massa crítica cada vez mais competente e especializada capaz de lidar com o problema. O fenômeno do aumento de animais selvagens em cativeiro deve ser encarado como uma realidade irreversível, sendo discutido e pensado em âmbito nacional com a responsabilidade e importância que o tema requer. A solução está na pressão da sociedade para que a classe política atue criando e implementando políticas ambientais, tornando a legislação ambiental vigente mais clara, objetiva e rígida, bem como alocando dentro do orçamento da união recursos financeiros e técnicos suficientes para o Ministério do Meio Ambiente.

Atualmente alguns locais que recebem animais selvagens mantêm estes em condições aquém do aceitável. Como provavelmente não retornarão mais para a natureza, é essencial que sejam tratados e estudados sob a ótica do bem estar, objetivando desta maneira a geração de informações que auxiliem a conservação dos espécimes que ainda estiverem em vida livre. Condições de cativeiro anormais como o manejo incorreto, a alimentação inadequada e a dimensão / ambientação dos recintos insuficientes são apenas alguns dos fatores que podem levar o animal à morte por influência direta ou indireta do estresse. As principais consequências ao

estresse são a queda da imunidade, a queda dos índices reprodutivos e os comportamentos estereotipados. Boas práticas como o enriquecimento ambiental ameniza a monotonia da vida em cativeiro, contribuindo assim para o bem estar animal. Monitorar esse estresse torna-se crucial para se evitar um número maior de mortes em cativeiro. Mais do que isso, a utilização de técnicas não invasivas que detectem com maior precisão os hormônios e metabólitos envolvidos no estresse são cada vez mais requeridas dos laboratórios. Assim sendo, o presente experimento procurou validar os melhores conjuntos comerciais disponíveis no mercado para a mensuração de glicocorticóides fecais de jaguatiricas, bem como estudar alguns aspectos da fisiologia endócrina do estresse visando elucidar algumas dúvidas e apontar novos caminhos.

1.1 Objetivos

- realizar a validação fisiológica dos conjuntos comerciais por meio do Desafio com ACTH em jaguatirica;
- validar e comparar os ensaios dos conjuntos comerciais “ImmuChem Double Antibody Corticosterona ^{125}I RIE” da ICN “Biomedicals” e “Coat-a-count Cortisol ^{125}I RIE” da DPC na mensuração dos metabólitos de glicocorticóides das fezes de jaguatiricas;
- verificar se a administração de ACTH induz a um aumento de progesterona.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Leopardus pardalis*:

A jaguatirica (*Leopardus pardalis*) é um felídeo não doméstico de porte médio e hábito solitário. Pesa em torno de 11 kg e sua atividade é predominantemente noturna. A gestação dura entre 70 a 85 dias, parindo de um a dois filhotes. A expectativa de vida em cativeiro é superior a 20 anos, enquanto que em vida livre fica em torno de 13 anos. É encontrada desde o Estado do Texas - Estados Unidos da América e oeste do México até o norte da Argentina (OLIVEIRA; CASSARO, 1999). Todas as espécies pertencentes ao gênero *Leopardus* constam da Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (LISTA...), gerada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA, bem como do Apêndice I do “Conservation International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna –CITES”, devido principalmente à perda e a fragmentação do seu “habitat” (PAZ, 2004).

FIGURA 1 – Jaguatirica (*Leopardus pardalis*)

2.2 Técnicas de apoio à conservação

Visando minimizar esse quadro, a Organização Mundial de Zoológicos (IUDZG) e o Grupo de Especialistas de Manejo em Cativeiro da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) indicam a utilização de técnicas de reprodução assistida como técnicas de apoio à conservação das espécies (IUDZG/CBSG, 1993). Assim sendo, foi preconizado o monitoramento endócrino a partir de metabólitos de hormônios fecais.

2.3 Estudo da fisiologia reprodutiva

O levantamento de informações básicas sobre a fisiologia reprodutiva objetivando mimetizar eventos naturais são fundamentais em técnicas de reprodução assistida e podem ser obtidas por meio da mensuração de metabólitos fecais dos hormônios sexuais (BROWN, 1996). A própria monitoração endócrina das técnicas empregadas na reprodução assistida também pode ser realizada desta maneira, como no caso das superovulações.

Além de ser uma técnica não invasiva de monitoramento remoto da fisiologia animal, a mensuração de metabólitos de glicocorticóides nas fezes pode refletir uma resposta adrenal a agentes potencialmente estressores (WASSER et al., 2000; WIELEBNOWSKI et al., 2002). A mensuração desses metabólitos na urina também tem sido utilizada devido ao seu caráter não invasivo. Entretanto os felídeos urinam em forma de aerossóis, dificultando desta maneira a sua colheita. Além disso, estudos sobre o metabolismo hormonal da Família *Felidae* demonstraram que a maioria dos metabólitos de hormônios esteróides de origem gonadal e adrenal foram excretados nas fezes (GRAHAM; BROWN, 1996 a; SCHATZ; PALME, 2001; TERIO; CITINO; BROWN, 1999; WIELEBNOWSKI et al., 2002).

2.4 Mecanismos do estresse o seu monitoramento

O mecanismo de resposta a um estímulo estressante é relativamente não específico e desencadeado para situações de luta ou fuga. Com o eixo hipotalâmico-hipofisiário-adrenal (HPA) ativado, o CRH (Hormônio Liberador de Corticotropina) produzido pelo hipotálamo atua na hipófise anterior liberando ACTH (Hormônio Adrenocorticotrófico), prolactina, β -endorfinas e vasopressina da hipófise posterior. Por sua vez o ACTH age na medula da adrenal liberando adrenalina e na zona fasciculata e reticular do córtex da adrenal liberando glicocorticóides (cortisol e corticosterona). Neste processo outra catecolamina, a noradrenalina, também é liberada do sistema nervoso simpático. O processo de adaptação aos agentes estressores é conhecido como Síndrome da Adaptação Geral (GAS – General Adaptation Syndrome) e consiste em três estágios: (1) reação de alarme, (2) resistência e (3) exaustão (NELSON, 1999).

Mesmo com o vasto conhecimento sobre o tema, é difícil precisar o que realmente é estresse. Para Nogueira e Silva (1997), o estresse foi conceituado como sendo como uma mudança no balanço homeostático, normalmente resultante de flutuações ambientais. Sabe-se que a resposta ao estímulo estressante pode ser dividida em três fases: alteração comportamental, estímulo do sistema simpático e ativação do HPA, resultando em um aumento nos níveis de cortisol que pode ser mensurado e servir de parâmetro na avaliação da resposta ao estresse (FOWLER, 1986). Estudos em mulheres também sugeriram que o aumento do cortisol pode refletir um aumento da atividade endógena do CRH (FERIN, 1999). A diferente reação ao estresse existe entre os sexos. Além de possuírem valores basais de cortisol e corticosterona mais altos, nas ratas o comportamento de resposta ao estresse é mais exacerbado (NELSON, 1999).

Fêmeas de pantera nebulosa (*Neofelis nebulosa*) produziram concentrações médias de corticóides fecais consistentemente mais altas que os machos (WIELEBNOWSKI et al., 2002). A secreção dos glicocorticóides foi influenciada pelo ritmo circadiano, havendo uma maior produção em momentos de maior necessidade energética como nas primeiras horas do dia logo após o acordar (NELSON, 1999). Outra prova da ação da sazonalidade no estresse foi a variação do tamanho da zona justamedular do córtex adrenal de gatos domésticos que aumentou nas fêmeas durante o estro e durante a gestação e nos machos após a castração (PARKES, 1966). Por outro lado, nem todo estímulo estressor pode ser considerado deletério ao organismo, pois por vezes este se faz necessário para garantir a sobrevivência do espécime e permitir a sua adaptação a mudanças ambientais (WIELEBNOWSKI et al., 2002).

O estresse possui um importante papel na supressão do eixo hipotalâmico-hipofisiário-gonadal (HPG). Os hormônios relacionados com o estresse podem influenciar funções sexuais em três níveis: no sistema nervoso central (inibe secreção de GnRH, o Hormônio Liberador de Gonadotrofinas), na hipófise (interfere na liberação do Hormônio Luteinizante - LH que é induzido pelo GnRH) e diretamente nas gônadas (altera o efeito estimulatório das gonadotrofinas na secreção de esteróides sexuais) (RIVIER; RIVEST, 1991). A produção de prolactina pela hipófise anterior suprime temporariamente as funções reprodutivas devido a sua ação em vários sítios do HPA. De outra forma as endorfinas produzidas para amenizar a dor podem suprimir a produção de GnRH (NELSON, 1999). O CRH possui neurônios localizados no núcleo paraventricular hipotalâmico e seus axons têm conexões diretas com os dendritos dos neurônios secretores de GnRH. Devido a esta característica anatômica, variações nos níveis de CRH influenciaram na secreção de GnRH e LH (RIVIER; RIVEST, 1991). Nas fêmeas, a fase do ciclo ovariano e conseqüentemente a condição hormonal podem modular a resposta das gonadotrofinas ao CRH. Macacas como ativação do HPA no meio da fase folicular resultaram em um

prolongamento desta fase e em uma redução na função luteínica no ciclo subsequente (FERIN, 1999). Já foi descrito em literatura a existência do ACTH e seus receptores em testículos e ovários (células da teca, estroma e oócitos maduros), sugerindo que este hormônio de liberação pode inibir de maneira direta a produção de hormônios esteróides (FERIN, 1999; NELSON, 1999; RIVIER; RIVEST, 1991). Os glicocorticóides suprimiram a produção de GnRH e LH via retroalimentação negativa, inibiram a formação de proteínas necessária para a produção de receptores hormonais, de enzimas esteroidogênicas e de alguma maneira também suprimiram diretamente a espermatogênese, visto que o cortisol inibiu a secreção de testosterona nos homens (NELSON, 1999). Vale ressaltar que Dobson, Essawy e Alam (1988) sugeriram que o cortisol não foi a causa da supressão da resposta do LH em ovelhas após a administração de ACTH, reforçando a idéia da sua atuação negativa diretamente no testículo. Para Rivier e Rivest (1991), existem evidências de que a resposta do eixo HPG a um estímulo adverso é potencialmente bifásica, com uma fase estimulatória inicial e, se o estresse for prolongado ou de grande magnitude, com uma fase inibitória subsequente, o que justificaria o aumento de hormônios como o LH nas fases iniciais. Ferin (1999) especula que durante o estresse, o pequeno mas significativo aumento da progesterona da adrenal que ocorre em resposta a ativação do HPA sinergiza com o estradiol circulante para aumentar a secreção de LH.

A administração de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico), ou Desafio com ACTH, mimetiza uma resposta natural da adrenal ao estresse causando um rápido aumento dos glicocorticóides nativos, como o cortisol e a corticosterona, seguido por um retorno destes para níveis basais em poucas horas (NORRIS 1996 *apud* WASSER, 2000 p. 261)¹. Nos estudos de Chatdarong et al. (2004) com gatas domésticas, os níveis séricos de cortisol retornaram para valores basais em um período aproximado de 180 min. após a administração do ACTH. As doses

¹NORRIS, D. O. **Vertebrate Endocrinology**. San Diego:Academic Press. 1996.

de ACTH administradas variaram muito: 50 UI, 100 UI (0,125 mg), 200 UI (0,250 mg), 400 UI, 500 UI (CHATDARONG et al., 2004; GOYMANN et al., 1999; GRAHAM; BROWN, 1996a; SCHATZ; PALME, 2001; TERIO et al., 1999; WIELEBNOWSKI et al., 2002; YOUNG et al., 2004). Schoeman et al. (2000) sugeriu que a administração de duas diferentes doses de ACTH (125 µg e 250 µg ou 100 UI e 200 UI respectivamente) em gatos obesos produziu picos similares de cortisol sérico. No entanto, a dose mais elevada produziu uma resposta mais prolongada.

Um pico de metabólitos de glicocorticóides foi detectado na primeira amostra fecal de guepardos (*Acinonyx jubatus*) após a injeção de ACTH, semelhante ao padrão apresentado em gatos domésticos (TERIO; CITINO; BROWN, 1999). Outros estudos em diferentes espécies de carnívoros também apontaram que a excreção dos metabólitos de glicocorticóides nas fezes ocorre entre as primeiras 24-72 horas após a administração do ACTH, esteja este fármaco na forma de apresentação normal, concentrado ou de deposição (GOYMANN et al., 1999; GRAHAM, BROWN, 1996b; MONFORT et al., 1998; SCHATZ; PALME, 2001; WIELEBNOWSKI et al., 2002).

2.5 Utilização de conjuntos comerciais na mensuração de metabólitos hormonais

A mensuração dos metabólitos do cortisol nas fezes já foi realizada utilizando-se conjuntos comerciais duplo anticorpo para corticosterona - radioimunoensaio (SCHATZ; PALME, 2001; TERIO; CITINO; BROWN, 1999), bem como no soro sanguíneo utilizando-se o conjunto comercial fase sólida DPC-radioimunoensaio (GRAHAM; BROWN, 1996a; TERIO; CITINO; BROWN, 1999). Vários experimentos indicaram o conjunto comercial ¹²⁵I Corticosterona duplo anticorpo da ICN “Biomedicals” – radioimunoensaio para a detecção de

metabólitos fecais de glicocorticóides de diferentes espécies não domésticas por este possuir uma taxa de reação cruzada bastante alta com diferentes metabólitos (GRAHAM; BROWN, 1996 a; HUNT et al., 2004; LYNCH et al., 2003; MONFORT et al., 1998; MÖSTLE; PALME, 2002; TERIO; CITINO; BROWN, 1999; WASSER et al., 2000; WIELEBNOWSKI et al., 2002).

2.6 Progesterona e outros hormônios esteróides extra-gonadais

Estudos demonstraram a produção de progesterona extra-gonadal oriunda principalmente da zona reticular do córtex adrenal (BOORD; GRIFFIN, 1999). Gatas inteiras e ovariectomizadas apresentaram altos níveis de progesterona sérica após o desafio com ACTH (CHATDARONG et al., 2004). O mesmo ocorreu em um caso de uma gata com hiperadrenocorticismo (BOORD; GRIFFIN, 1999). Um aumento significativo de progesterona sérica foi detectado horas após a administração de ACTH em ratas (FAJER; HOLZBAUER; NEWPORT, 1971), em cervos (ASHER; PETERSON; DUGANZICH, 1989), em vacas (BOLAÑOS; MOLINA; FORSBERG, 1997), em porcas (TSUMA et al., 1998) e finalmente em ovelhas (VAN LIER et al., 1998). A progesterona produzida pela adrenal pode interagir com o HPG. Dobson, Essawy e Alam (1988) sugeriram a realização de outros testes para estabelecer de que maneira o pequeno aumento da progesterona, presumidamente originária da adrenal, influenciou na diminuição da liberação de estradiol induzido pelo LH. Dobson e Smith (1995) discutiram a possibilidade da inibição da produção de LH em consequência ao efeito indireto de estimulação da secreção de progesterona da adrenal pelo ACTH. Há relatos de outros hormônios esteróides sendo produzidos pela adrenal. Para Nelson (1999), mesmo sendo apenas de 2-3% da concentração de andrógenos produzidos pela adrenal dos machos, os andrógenos (primariamente androstenediona) secretados pela adrenal das fêmeas foi capaz de interromper processos reprodutivos.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Área e unidade de estudo

Para a extração dos metabólitos fecais dos glicocorticóides, foram utilizadas fezes de duas jaguatiricas machos e três jaguatiricas fêmeas (Quadro 1) que se encontravam pareadas no Centro Brasileiro de Felinos Neotropicals sediado na Associação Mata Ciliar (AMC), na cidade de Jundiaí/São Paulo. Neste local a dieta oferecida foi composta por ratos mortos proveniente do descarte de biotérios (3-4 vezes por semana) do Instituto de Biociências e da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, ambos da Universidade de São Paulo, pescoço de frango (3 vezes por semana), coração bovino (no mínimo 1 vez a cada 15 dias), suplemento vitamínico e mineral (Aminomix Pet®; Vetnil, SP, Brazil) e água *ad libitum*. As dimensões dos recintos do módulo um (1) onde estavam os felídeos do experimento (Figura 1) são 7m x 3m x 2,5m, sendo coberto por laje e tendo na porção frontal uma tela. O piso correspondente à cobertura da laje era de cimento, tendo a área externa boa insolação, troncos, vegetação rasteira e arbustos. O cambiamento era de cimento, contendo em seu interior recipiente para água e uma caixa de madeira com graminha.

ANIMAL (apelido)	Número de Registro	“Studbook”	IDADE (anos)
PIG _(m)	92	288	5 (nascido em cativeiro em fev/2000)
FOZ _(m)	109	108	>12
JUSSARA _(f)	81	254	8 (nascida em cativeiro em 19/02/1997)
COTÓ _(f)	107	240	>12
ILHA _(f)	108	285	≅ 4

(m): macho; (f): fêmea.

Quadro 1- Número do registro, número do “studbook” e a idade dos animais utilizados no experimento.

Figura 2 – Vista dos recintos das jaguatiricas na Associação Mata Ciliar, Jundiaí/ SP – set. 2004

3.2 Delineamento Experimental:

Inicialmente os casais de jaguatiricas foram separadas, sendo que durante o decorrer do experimento um indivíduo do casal ficou alojada no cambiamanto, visando desta maneira facilitar a colheita das amostras. Os animais receberam na alimentação corante (Coralim Mix[®], <www.mix.ind.br>) com diferentes tonalidades visando a individualização das fezes, já que estes se encontram pareados. O experimento foi conduzido em um período de dez dias (Quadro 2). O dia zero (0) foi definido como sendo o marco divisório entre o período sem tratamento [do dia quatro negativo (-4) ao dia um negativo (-1)] e do período com tratamento [do dia um (1) ao dia cinco (5)]. Neste dia pela manhã, com o animal contido em caixa de prensa, foi administrado uma dose total de 100 UI IM de tetracosactídio – ACTH (Synacthene[®] Dépôt – Novartis - uso humano, 800 UI/mg - 1mg em 1mL) em cada indivíduo (Figura 2). As amostras fecais (totalidade do bolo fecal) foram colhidas uma vez ao dia durante todo o período de dez dias. Posteriormente a esse procedimento o animal foi solto no seu recinto. O animal Pig foi escolhido para ser

utilizado como controle negativo visando determinar o estresse da contenção e, portanto não sendo injetado com o tetracosactídio, mas somente estimulado com a punção da agulha. Este macho era sabidamente um animal nascido em cativeiro e com uma maior probabilidade de estar bem adaptado às condições de cativeiro. Além disso, como se objetivou estudar as progestinas extra-gonadais, considerou-se o fato dos machos provavelmente não produzir este hormônio.

Dia -4	Dia -3	Dia -2	Dia -1	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
Colheita de fezes	Colheita de fezes	Colheita de fezes	Colheita de fezes	ACTH Colheita de fezes	Colheita de fezes	Colheita de fezes	Colheita de fezes	Colheita de fezes	Colheita de fezes

Quadro 2 - Cronograma do experimento Desafio com ACTH realizado em jaguatiricas na Associação Mata Ciliar, Jundiaí/SP – set. 2004

Figura 3 – Contenção física das jaguatiricas em caixa de prensa realizada na Associação Mata Ciliar em Jundiaí/ SP – set. 2004

3.3 Conservação e processamento das amostras

Imediatamente após a colheita manual, as amostras foram conservadas em sacos plásticos com identificação a -5°C e posteriormente os metabólitos hormonais foram extraídos no Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH) do Departamento de Reprodução Animal (VRA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP) segundo a técnica descrita por Shwarzemberger et al. (1991). Ressalta-se que os animais não defecaram diariamente. Pesou-se entre 0,48 g e 0,52 g de fezes úmidas que foram colocadas dentro de um tubo de fundo cônico de 15 mL com tampa de rosca; adicionou-se 5 mL de metanol 80%. As fezes foram dissolvidas com auxílio de bastão de vidro e agitadas por 30 segundos; todos os tubos foram homogeneizados por 12 horas. Após esta etapa, centrifugou-se as amostras a 270 G por 15 min. e reservou-se o sobrenadante para o ensaio em microtubos que posteriormente foram congelados. Para o ensaio, as amostras foram diluídas no diluidor proveniente do conjunto comercial ICN. A mensuração desses metabólitos foi realizada por meio da técnica do radioimunoensaio utilizando os conjuntos comerciais “ImmuChem Double Antibody Corticosterona ^{125}I RIE” da ICN “Biomedicals” e “Coat-a-count Cortisol ^{125}I RIE” da DPC (Anexo A).

Aproveitou-se estudar o comportamento das progestinas, dos estrógenos e dos andrógenos frente ao desafio com ACTH por meio da técnica do enzaimunoensaio (Anexo A). As progestinas, estrógenos e andrógenos foram mensuradas com os anticorpos contra 4-pregnen-3,20-diona (CL425, Dr. Coralie Munro - UC Davis), contra 17β Estradiol (R4972, Dr. Coralie Munro - UC Davis) e contra Testosterona (R156/7, Dr. Coralie Munro - UC Davis) no “Center for Conservation and Research of Endangered Wildlife (CREW)” do “Cincinnati Zoo &

Botanical Garden”. As amostras enviadas via correio estavam em microtubos fechados com filme plástico e tampa de segurança, acondicionados em caixas próprias sem refrigeração, uma vez que a natureza do extrato é um solvente orgânico (metanol ou etanol). Esse contato foi estabelecido após um estágio técnico realizado no mês de janeiro de 2004 que foi de grande valia tanto para o pesquisador quanto para o incremento de técnicas na rotina laboratorial do LDH.

Previamente foi realizado com o conjunto comercial da DPC um teste para comparar o método de extração anteriormente descrito com o método sugerido por Wasser et al. (1994). Foram pesadas 0,2 g de fezes secas e posteriormente diluídas em 5 mL de etanol 90%. Colocou-se em fervura durante 25 min. repondo-se sempre o etanol 90% para manter o volume inicial. Centrifugou-se por 15 min a 2.800 rpm (500g), o sobrenadante foi recuperado e o sedimento resultante foi ressuspendido em mais 5 mL de etanol 90%, agitado e centrifugado novamente por 15 min. a 2.800 rpm (500g). Os dois sobrenadantes foram combinados, secos completamente e dissolvidos em 1 mL de metanol. O extrato foi então homogeneizado por 1 min. e levado para o banho ultrassônico por 15 min. As amostras foram finalmente diluídas para o ensaio em PBS Gelatina 0,1% [Fosfato de sódio dibásico 12 H₂O (21,85g); Fosfato de sódio monobásico 1 H₂O (5,4g); Azida Sódica (1,0g); Cloreto de Sódio (9,0g), Gelatina (1,0g); completar o volume para 1L com água destilada; pH 7,0].

No radioimunoensaio os resultados para os metabólitos de glicocorticóides foram expressos em ng/g fezes. Para chegar-se a esses valores, o resultado da concentração do ensaio do conjunto comercial da ICN (ng/mL) e da DPC (µg/dL) foi multiplicado pelo valor do volume final da extração, pelo valor da diluição do ensaio, pelo fator 1,27 ou 1,21 (valor da recuperação subtraído de 1) e dividido pelo peso da amostra. O volume final segundo o protocolo modificado de Schwarzenberger et al. (1991) foi de 5mL, com uma taxa de recuperação de 73%. O volume

final segundo o protocolo modificado de Wasser et al. (1994) foi de 1 mL, com uma taxa de recuperação de 79%. Já os valores da diluição para o ensaio do conjunto comercial DPC foi de 1:4 e para o conjunto comercial ICN foi de 1:100.

Para o ensaio imunoenzimático o valor da concentração (pg/50µl) das progestinas, estrógenos e andrógenos foi multiplicado por 20 para chegar-se a 1 mL, pela diluição da extração (1:10), pela diluição do ensaio (1:300) e finalmente dividido por 1.000 e pelo peso das fezes, sendo assim expresso em pg/g fezes. Nesse caso, os machos também serviram como controle negativo da produção de progesterona pelo ovário.

Para a validação dos ensaios realizou-se a curva de paralelismo a partir de um “pool” de amostras e destas fizeram-se diluições seriadas. Cada diluição foi mensurada no ensaio como uma amostra individual e posteriormente comparadas com os valores da curva padrão para verificar o paralelismo. Com esse procedimento, além de se descobrir a diluição ideal do ensaio (valor da diluição seriada que se encontra no meio da curva), foi possível saber se os metabólitos no extrato estão interagindo com o anticorpo de uma maneira similar daquela que ocorre com os hormônios utilizados como padrões.

3.4 Taxas de sensibilidade e reação cruzada dos conjuntos comerciais e dos anticorpos

O conjunto comercial “Coat-a-count Cortisol ¹²⁵I RIE” da DPC tem uma sensibilidade de 0,2 µg/dL (5,5 nmol/L) com porcentagem de reação cruzada para Cortisol (100%), Betametasona (1,6%), Corticosterona (0,94%), Cortisona (0,98%), 11-Deoxicortisol (11,4%), Metilprednisolona (12%), Prednisolona (76%), Prednisona (2,3%), sendo que o restante tem menos que 0,5%. Já o conjunto comercial “ImmuChem Double Antibody Corticosterona ¹²⁵I RIE” da ICN

“Biomedicals” tem uma sensibilidade de 7,7 ng/mL com uma porcentagem de reação cruzada com Corticosterona (100%), Desoxicorticosterona (0,34%), Testosterona (0,1%) e o restante com menos que 0,05%.

Para o ensaio imunoenzimático, o anticorpo CL 425 era contra 4-pregnen-3,20-diona possui uma sensibilidade de 3,9pg para 500pg/poço com uma porcentagem de reação cruzada (ex.: [pg do 4-pregnen-3,20-diona/outra esteróide] x 100) de 4-pregnen-3,20-diona (100%), 4-pregnen-3B-ol-20-ona (172%), 4-pregnen-3a-ol-20-ona (188%), 4-pregnen-11a-ol-3,20-diona (147%), 4-pregnen-11B-ol-3,20-diona (2,7%), 5a-pregnan-3a,20B-diol (<0,1%), 5a-pregnan-3a-ol-20-ona (64%), 5a-pregnan-3B-ol-20-ona (94%), 5a-pregnan-3,20-diona (55%), 5B-pregnan-3a,20a-diol (<0,1%), 5B-pregnan-3,20-diona (8%), 5B-pregnan-3a-ol-20-ona (2,5%), 5B-pregnan-3B-ol-20-ona (12,5%), Androstendiona (<0,1%), Corticosterona (<0,1%). O anticorpo R 4972 contra 17β Estradiol possui uma sensibilidade de 3,9 pg para 250 pg/poço com uma porcentagem de reação cruzada com 17β Estradiol (100%), Estrona (3,3%), Progesterona (0,8%), Testosterona (1,0%), Androstenediona (1,0%), outros esteróides (<1,0%). O anticorpo R 156/7 contra Testosterona possui uma sensibilidade de 3,125 pg para 200 pg/poço com uma porcentagem de reação cruzada com Testosterona (100%), 5a-Dihydrotestosterona (57,37%), Androstenediona (0,27%), Androsterona (0,04%), β-Estradiol (0,02%), Progesterona (<0,02%), Hydrocortisona (<0,02%).

3.5 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o programa The SAS System for Windows V8 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2000, nº serial GTA-31722-232). Através do aplicativo Guided Data Analysis estes dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade

das variâncias. Caso não obedecessem a estas premissas, eram transformados e se a normalidade não fosse obtida, empregava-se então o procedimento NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica. Para a descrição dos resultados, foram empregados as médias e os erros padrões dos dados originais e o nível de significância dos dados transformados quando necessária a transformação, bem como a análise não paramétrica quando era necessária sua utilização. Os testes foram fixados em $p < 0,05$ para a rejeição da hipótese de nulidade. As correlações e as regressões também foram calculadas pelo SAS. Os valores do animal Pig não foram acrescentados nos testes por se tratar do controle negativo.

Os valores médios e os desvios padrões para determinar-se o valor de pico foram calculados no programa “Excel - Microsoft Office”. Este foi determinado considerando-se o valor da média somado a dois desvios padrões. Para o cálculo do valor de pico nos experimentos com o Desafio com ACTH foi utilizado o valor da média somado a dois desvios padrões, sendo que estes desvios padrões foram calculados com os valores anteriores ao tratamento. No caso do animal pig (controle negativo), foram utilizados todos os valores no cálculo do desvio padrão.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

O coeficiente de variação baixo para o conjunto comercial da ICN foi de 1,18%, enquanto que o coeficiente de variação alto foi de 10,53%. Já para o conjunto comercial da DPC o coeficiente de variação baixo foi de 7,59%, enquanto que o coeficiente de variação alto foi de 2,81%.

Na técnica do ensaio imunoenzimático (CL 425) o coeficiente de variação baixo foi de 6,96% e o coeficiente de variação alto foi de 7,17%.

Na análise de regressão que utilizou como premissa seriada elevada a 1,5 e realizada no teste de paralelismo do conjunto comercial ICN, o coeficiente foi de 0,99 ($p=0,0006$).

Na análise de regressão que utilizou como premissa paramétrica e realizada no teste de paralelismo do anticorpo CL425 (progestinas), o coeficiente foi de 0,99 ($p<0,0001$).

4.1 Protocolos de extração

Na análise estatística foram empregados as médias e os erros padrões dos dados originais e o nível de significância dos dados transformados para Logaritmo na base 10, por não obedecerem a normalidade dos resíduos (Tabela 1). Essa transformação também ocorreu para o cálculo da correlação e na análise de regressão entre as extrações. A correlação entre as técnicas de extração foi de 0,90 ($p<0,0001$) e o coeficiente de regressão entre as extrações foi de 0,80 ($p<0,0001$).

Tabela 1 - Média e erro padrão dos valores dos glicocorticóides extraídos de fezes da jaguatirica Cotó segundo as técnicas de Wasser et al. (1994) e de Schwarzenberger et al. (1991) e mensurado por meio do conjunto comercial da DPC - radioimunoensaio no Laboratório de Dosagens Hormonais – Departamento de Reprodução Animal da FMVZ/USP, São Paulo/SP - agosto de 2003

Wasser	Shwarzenberger	p
59.223,61±12725.36	103.334,56±19010.37	0,0657
ng/g fezes úmidas	ng/g fezes úmidas	

A média dos valores de glicocorticóides sem haver a conversão, extraídos por meio da técnica de Wasser et al. (1994) e mensurados pelo conjunto comercial da DPC - radioimunoensaio para o animal Cotó foi de 2,5215 µg/dl, com uma recuperação de 79%.

A média dos valores de glicocorticóides sem haver a conversão, extraídos por meio da técnica de Schwarzenberger et al. (1991) e mensurados pelo conjunto comercial da DPC - radioimunoensaio para o animal Cotó foi de 2,066 µg/dl, com uma recuperação de 73%.

Gráfico 1 - Perfil de glicocorticóides extraídos de fezes da jaguatirica Cotó segundo as técnicas de Wasser et al. (1994) e de Schwarzenberger et al. (1991) e mensurado por meio do conjunto comercial da DPC - radioimunoensaio no Laboratório de Dosagens Hormonais – Departamento de Reprodução Animal da FMVZ/USP, São Paulo/SP - agosto de 2003

4.2 Desafio com ACTH

A média e desvio padrão dos valores para os glicocorticóides do animal Foz (Gráfico 2) mensurado no conjunto comercial ICN foi de $281.313,70 \pm 106.745,58$ ng/g fezes, sendo o valor de pico estipulado em 494.804,88 ng/g fezes.

A média e desvio padrão dos valores para os glicocorticóides do animal Foz (Gráfico 2) mensurado no conjunto comercial DPC foi de $66.144,30 \pm 44.634,37$ ng/g fezes, sendo o valor de pico estipulado em 5.413,06 ng/g fezes.

No dia 01 do perfil do conjunto comercial da ICN houve um pico com valor de 1.245.098,04 ng/g fezes.

▲ Dia da administração do ACTH.

Gráfico 2 - Perfil de glicocorticóides fecais da jaguatirica Foz submetida ao Desafio com ACTH. Extração segundo a técnica modificada de Schwarzenberger et al. (1991) e mensurado por meio dos conjuntos comerciais da ICN e DPC- radioimunoensaio no Laboratório de Dosagens Hormonais – Departamento de Reprodução Animal da FMVZ/USP, São Paulo/SP - outubro de 2004

A média e desvio padrão dos valores para os glicocorticóides do animal Jussara (Gráfico 3) mensurado no conjunto comercial ICN foi de $291.549,60 \pm 62.320,39$ ng/g fezes, sendo o valor de pico estipulado em 416.190,40 ng/g fezes.

A média e desvio padrão dos valores para os glicocorticóides do animal Jussara (Gráfico 3) mensurado no conjunto comercial DPC foi de $50.169,08 \pm 10.905,67$ ng/g fezes, sendo o valor de pico estipulado em 71.980,41 ng/g fezes.

No dia 01 do perfil do conjunto comercial da ICN houve um pico com valor de 941.438,3 ng/g fezes e no perfil do conjunto comercial DPC houve um pico com valor de 111.526,3 ng/g

fezes neste mesmo
dia.

▲ Dia da administração do ACTH.

Gráfico 3 - Perfil de glicocorticóides fecais da jaguatirica Jussara submetida ao Desafio com ACTH. Extração segundo a técnica modificada de Schwarzenberger et al. (1991) e mensurado por meio dos conjuntos comerciais da ICN e DPC- radioimunoensaio no Laboratório de Dosagens Hormonais – Departamento de Reprodução Animal da FMVZ/USP, São Paulo/SP - outubro de 2004

A média e desvio padrão dos valores para os glicocorticóides do animal Ilha (Gráfico 4) mensurado no conjunto comercial ICN foi de $135.818,7 \pm 37.049,42$ ng/g fezes, sendo o valor de pico estipulado em 209.917,5 ng/g fezes.

A média e desvio padrão dos valores para os glicocorticóides do animal Ilha (Gráfico 4) mensurado no conjunto comercial DPC foi de $19.747,93 \pm 9.795,88$ ng/g fezes, sendo o valor de pico estipulado em 39.339,69 ng/g fezes.

No dia 01 do perfil do conjunto comercial da ICN houve um pico com valor de 257.199,9 ng/g

fezes

▲ Dia da administração do ACTH.

Gráfico 4 - Perfil de glicocorticóides fecais da jaguatirica Ilha submetida ao Desafio com ACTH. Extração segundo a técnica modificada de Schwarzenberger et al. (1991) e mensurado por meio dos conjuntos comerciais da ICN e DPC- radioimunoensaio no Laboratório de Dosagens Hormonais – Departamento de Reprodução Animal da FMVZ/USP, São Paulo/SP - outubro de 2004

A média e desvio padrão dos valores para os glicocorticóides no controle negativo animal Pig (Gráfico 5) mensurado no conjunto comercial ICN foi de $168.639,5 \pm 54.285,69$ ng/g fezes, sendo o valor de pico estipulado em 278.290,8 ng/g fezes.

A média e desvio padrão dos valores para os glicocorticóides no controle negativo animal Pig (Gráfico 5) mensurado no conjunto comercial DPC foi de $13.548,03 \pm 12.592,19$ ng/g fezes, sendo o valor de pico estipulado em 38.732,42 ng/g fezes.

Gráfico 5 - Perfil de glicocorticóides fecais da jaguatirica Pig (controle negativo) submetida ao Desafio com ACTH. Extração segundo a técnica modificada de Schwarzenberger et al. (1991) e mensurado por meio dos conjuntos comerciais da ICN e DPC-radioimunoensaio no Laboratório de Dosagens Hormonais – Departamento de Reprodução Animal da FMVZ/USP, São Paulo/SP - outubro de 2004.

4.2.1 Análise estatística

Na análise estatística foram empregados as médias e os erros padrões dos dados originais e o nível de significância dos dados transformados para Logaritmo na base 10, por não obedecerem a normalidade dos resíduos.

ab: Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os dias do tratamento ($p < 0,05$);

*: Indica diferença estatística entre os Kits DPC e ICN no determinado dia do tratamento ($p < 0,05$).

Gráfico 6 – Médias, erros padrões e nível de significância dos valores dos glicocorticóides fecais das jaguatiricas Pig, Ilha e Jussara submetidas ao desafio com ACTH. Extração segundo a técnica modificada de Schwarzenberger et al. (1991) e mensurado por meio dos conjuntos comerciais da ICN e DPC- radioimunoensaio no Laboratório de Dosagens Hormonais – Departamento de Reprodução Animal da FMVZ/USP, São Paulo/SP - outubro de 2004.

Tabela 2 – Médias, erros padrões e nível de significância dos valores dos glicocorticóides fecais das jaguatiricas Pig, Ilha e Jussara submetidas ao desafio com ACTH. Extração segundo a técnica modificada de Schwarzenberger et al. (1991) e mensurado por meio dos conjuntos comerciais da ICN e DPC- radioimunoensaio no Laboratório de Dosagens Hormonais – Departamento de Reprodução Animal da FMVZ/USP, São Paulo/SP - outubro de 2004

Dia do tratamento	DPC	ICN	p
-4	30733,49 ± 22237,96 ^{ab}	101135,03 ± 32551,14 ^a	0,2619
-3	37692,65 ± 19334,77 ^{ab}	131722,81 ± 27723,10 ^a	0,0605
-2	36040,90 ± 1366,02 ^{ab}	152669,85 ± 20736,52 ^a	0,0006
-1	34058,60 ± 7900,24 ^{ab}	182410,60 ± 42179,31 ^a	0,0054
0	66956,28 ± 36786,93 ^{ab}	205483,32 ± 83811,32 ^a	0,1326
1	92991,19 ± 28555,63 ^a	814578,75 ± 292150,47 ^b	0,0282
2	37238,49 ± 11575,09 ^{ab}	192477,13 ± 32889,12 ^a	0,0097
3	53951,84 ± 9368,86 ^{ab}	166040,67 ± 57703,45 ^a	0,1164
4	27140,66 ± 5899,59 ^{ab}	160545,22 ± 50493,24 ^a	0,0123
5	29412,42 ± 21642,61 ^b	162061,72 ± 41112,36 ^a	0,1690

^{ab}: Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas (p<0,05);

4.3 Progestinas, estrógenos e andrógenos

A média dos valores para as progestinas para o animal Foz (Gráfico 7) mensurado por meio da técnica do enzimaímunoensaio foi de $4.660,73 \pm 1.427,79$ ng/g fezes, sendo o valor de pico estipulado em 7.516,32 ng/g fezes.

A média dos valores para os estrógenos para o animal Foz (Gráfico 7) mensurado por meio da técnica do enzimaímunoensaio foi de $4.782,56 \pm 2.567,71$ ng/g fezes, sendo o valor de pico estipulado em 9.918 ng/g fezes.

A média dos valores para os andrógenos para o animal Foz (Gráfico 7) mensurado por meio da técnica do enzimaímunoensaio foi de $7.618,65 \pm 2.154,39$ ng/g fezes, sendo o valor de pico estipulado em 11.927,45 ng/g fezes.

▲ Dia da administração do ACTH.

Gráfico 7 - Perfil de progesterona, estrogênio e andrôgeno fecais da jaguatirica Foz submetida ao Desafio com ACTH. Extração segundo a técnica modificada de Schwarzenberger et al. (1991) e mensurados com os anticorpos CL425, R4972 e R156/7-enzimaimunoensaio no “Center for Conservation and Research of Endangered Wildlife (CREW) do Cincinnati Zoo & Botanical Garden”, Cincinnati/Ohio - fevereiro de 2005

A média dos valores para as progesteronas para o animal Jussara (Gráfico 8) mensurado por meio da técnica do enzimaímunoensaio foi de $19.565,25 \pm 6.973,21$ ng/g fezes, sendo o valor de pico estipulado em 33.511,68 ng/g fezes.

A média dos valores para os estrogênios para o animal Jussara (Gráfico 8) mensurado por meio da técnica do enzimaímunoensaio foi de $2.763,12 \pm 1.869,47$ ng/g fezes, sendo o valor de pico estipulado em 6.502,08 ng/g fezes.

A média dos valores para os andrôgenos para o animal Jussara (Gráfico 8) mensurado por meio da técnica do enzimaímunoensaio foi de $1.498,62 \pm 2.128,32$ ng/g fezes, sendo o valor de pico estipulado em 5.755,26 ng/g fezes.

▲ Dia da administração do ACTH.

Gráfico 8 - Perfil de progesterona, estrógenos e andrôgenos fecais da jaguatirica Jussara submetida ao Desafio com ACTH. Extração segundo a técnica modificada de Schwarzenberger et al. (1991) e mensurados com os anticorpos CL425, R4972 e R156/7- enzimaímunoensaio no “Center for Conservation and Research of Endangered Wildlife (CREW) do Cincinnati Zoo & Botanical Garden”, Cincinnati/Ohio - fevereiro de 2005

A média dos valores para as progesteronas para o animal Ilha (Gráfico 9) mensurado por meio da técnica do enzimaímunoensaio foi de $5.089,15 \pm 1.051,36$ ng/g fezes, sendo o valor de pico estipulado em 7.191,88 ng/g fezes.

A média dos valores para os estrógenos para o animal Ilha (Gráfico 9) mensurado por meio da técnica do enzimaímunoensaio foi de $5.639,25 \pm 1.230,37$ ng/g fezes, sendo o valor de pico estipulado em 8.100 ng/g fezes.

A média dos valores para os andrôgenos para o animal Ilha (Gráfico 9) mensurado por meio da técnica do enzimaímunoensaio foi de $7.726,51 \pm 2.294,30$ ng/g fezes, sendo o valor de pico estipulado em 12.315,11 ng/g fezes.

No perfil das progestinas, ocorreu um pico de valor 9.792,70 ng/g fezes do dia 01 e de valor 9.191,88 ng/g fezes no dia 04. No perfil dos andrógenos, ocorreu um pico de valor 12.816 ng/g fezes no dia 04. No perfil dos estrógenos, ocorreu um pico de valor 9.778,82 ng/g fezes no dia 01, de 11.929,06 ng/g fezes no dia 04 e finalmente no valor de 9.486,73 ng/g fezes no dia 05.

▲ Dia da administração do ACTH.

Gráfico 9 - Perfil de progestinas, estrógenos e andrógenos fecais da jaguatirica Ilha submetida ao Desafio com ACTH. Extração segundo a técnica modificada de Schwarzenberger et al. (1991) e mensurados com os anticorpos CL425, R4972 e R156/7-enzimaimunoensaio no “Center for Conservation and Research of Endangered Wildlife (CREW) do Cincinnati Zoo & Botanical Garden”, Cincinnati/Ohio - fevereiro de 2005

A média dos valores para as progestinas no controle negativo animal Pig (Gráfico 10) mensurado por meio da técnica do enzimaímunoensaio foi de 6.562,07 $\pm$ 3.693,07 ng/g fezes, sendo o valor de pico estipulado em 13.948,22 ng/g fezes.

A média dos valores para os estrógenos no controle negativo animal Pig (Gráfico 10) mensurado por meio da técnica do ensaio imunoenzimático foi de $4.140,77 \pm 2.538,28$ ng/g fezes, sendo o valor de pico estipulado em 9.217,35 ng/g fezes.

A média dos valores para os andrógenos no controle negativo animal Pig (Gráfico 10) mensurado por meio da técnica do ensaio imunoenzimático foi de $7.874,69 \pm 4.330,69$ ng/g fezes, sendo o valor de pico estipulado em 16.536,08 ng/g fezes.

No perfil dos andrógenos, ocorreu um pico de valor 17.862,96 ng/g fezes no dia 0. No perfil dos estrógenos, ocorreu um pico de valor 10.005,0 ng/g fezes no dia 0.

Gráfico 10 - Perfil de progesterona, estrógenos e andrógenos fecais da jaguatirica Pig (controle negativo) submetida ao Desafio com ACTH. Extração segundo a técnica modificada de Schwarzenberger et al. (1991) e mensurados com os anticorpos CL425, R4972 e R156/7- ensaio imunoenzimático no "Center for Conservation and Research of Endangered Wildlife (CREW) do Cincinnati Zoo & Botanical Garden", Cincinnati/Ohio - fevereiro de 2005

4.3.1 Análise Estatística

Para o cálculo da correlação os dados foram transformados para Logaritmo na base 10 por não obedecerem à normalidade dos resíduos. A correlação entre as progestinas mensuradas com o anticorpo CL 425 e os metabólitos de glicocorticóides das fêmeas mensurado com o conjunto comercial ICN foi de 0,69 ($p= 0,0015$) e a correlação entre as progestinas mensuradas com o anticorpo CL 425 e os glicocorticóides mensurados com o conjunto comercial DPC foi de 0,64 ($p= 0,0042$). Não houve correlação no caso dos machos tanto para o conjunto comercial ICN ($-0,17$, $p= 0,4553$) quanto para o conjunto comercial DPC ($-0,32$, $p=0,1661$).

5 DISCUSSÃO

5.1 Protocolos de extração

Apesar da taxa de recuperação da técnica de extração de Wasser et al. (1994) ter sido um pouco superior que a de Schwarzenberger et al. (1991) (79% e 73% respectivamente), houve forte correlação entre as duas técnicas de extração (0,90, $p < 0,0001$). As informações contidas no Gráfico 1 foram muito claras ao demonstrar essa semelhança. Estes dados corroboram com os obtidos por Wasser et al. (2000) em que a média de metabólitos de cortisol extraídos por meio da técnica de Wasser et al. (1994) foi de 9,0 ng/g ($\cong$ 90-100% de recuperação). Neste mesmo artigo, a média de metabólitos de cortisol extraídos por meio da técnica de Schwarzenberger et al. (1991) foi de 9,2 ng/g ($\cong$ 85-100% de recuperação). No presente experimento, a média dos valores de glicocorticóides obtidos com a técnica de extração de Wasser et al. (1994) sem haver a conversão para ng/g fezes úmidas foi de 2,521 μ g/dl, e com a técnica de Schwarzenberger et al. (1991) esse valor foi de 2,066 μ g/dl. Essas informações comprovam que para a extração de metabólitos de glicocorticóides em fezes de jaguatiricas foi indiferente a escolha da técnica, pois os valores obtidos das duas técnicas se aproximaram. Porém é imprescindível lembrar que a técnica de Schwarzenberger et al. (1991) é bem mais simples de ser executada, exigindo um menor número de etapas e de equipamentos. Vale ressaltar que mesmo que os felídeos secretem a maioria dos metabólitos dos glicocorticóides na forma conjugada (polar) (SCHATZ; PALME, 2001; YOUNG et al., 2004), as duas técnicas extraíram com eficiência estes metabólitos. O efeito do tempo de estocagem das amostras aparentemente também não influenciou nos resultados das

mensurações dos metabólitos dos glicocorticóides, diferentemente do que apresentou Lynch et al. (2003) em seus relatos.

5.2 Desafio com ACTH

O conjunto comercial da ICN detectou com maior clareza o aumento das concentrações dos metabólitos de glicocorticóides após o desafio com ACTH. Ao se analisar os gráficos evidencia-se que este conjunto comercial reflete o evento biológico por meio de um perfil mais acentuado nas variações. Isso ficou demonstrado nos perfis do animal Foz (Gráfico 2) e do animal Ilha (Gráfico 4) que não acusaram pico por meio do conjunto comercial da DPC. Não houve diferença nas concentrações comparando a resposta do macho e das fêmeas. Todos os animais obtiveram o aumento nas concentrações dos metabólitos de glicocorticóides no dia posterior ao desafio como demonstraram Graham e Brown (1996b). O perfil no animal controle Pig (Gráfico 5) não apresentou pico no dia um, sugerindo que a contenção física em caixa de prensa não interferiu na elevação das concentrações dos metabólitos de glicocorticóides. Especificamente no caso deste animal, a sua contenção física foi a mais tranqüila de todas. Também não houve nenhuma relação entre a média das concentrações destes metabólitos com a procedência dos animais, ou seja, animais nascidos em cativeiro não obtiveram valores mais baixos. O gráfico 6 e a tabela 2 apontaram a discrepância da performance dos dois conjuntos comerciais com uma grande vantagem para o conjunto comercial da ICN. Houve diferenças estatísticas entre os conjuntos comerciais nos dias 2 (dois) negativo, 1 (um) negativo, 1 (um), 2 (dois) e 4 (quatro). Salienta-se que a diferença mais importante foi justamente a do dia um, fato este que acusou o aumento das concentrações dos metabólitos de glicocorticóides em resposta ao ACTH. Na tabela 2, os valores do conjunto comercial da DPC que têm as letras ab, não diferiram estatisticamente nem dos

valores que têm a letra a, nem dos que têm b. O dia 5 (cinco) foi b, no dia 1 (um) foi a e nos outros dias foi ab. Isso significa que os únicos dias diferentes entre si foram os dias 5 (cinco) e 1 (um). Os outros dias não diferiram nem entre si e nem quando comparados com os dias 5 (cinco) e 1 (um). Isso significa que o conjunto comercial DPC só conseguiu diferenciar o dia 1 (um) do dia 5 (cinco). Pelo conjunto comercial ICN, o dia 1, marcado com a letra b, diferiu de todos os outros dias, marcados com a letra a. Isso significou que este conjunto comercial conseguiu diferenciar estatisticamente o dia 1 (um; dia do pico) de todos os outros dias, o que foi muito interessante, já que os outros dias configuraram níveis basais.

Essas informações corroboram com as de Wasser et al. (2000) que demonstraram que a mensuração de glicocorticóides fecais utilizando o anticorpo para corticosterona da ICN pode efetivamente detectar mudanças na atividade endógena da adrenal em um amplo espectro de espécies de mamíferos e aves, pois este possui uma reação cruzada com múltiplos metabólitos destes glicocorticóides excretados nas fezes de uma variedade de espécies em resposta a ativação adrenal. Möstle e Palme (2002) afirmaram que o anticorpo corticosterona da ICN trouxe melhores resultados na mensuração de glicocorticóides fecais. Isso confirmou que as mensurações com o conjunto comercial da ICN apresentaram coerência biológica e, portanto validou fisiologicamente o conjunto. Diferentemente do experimento com o desafio com ACTH, as concentrações dos glicocorticóides fecais após a superovulação e a laparoscopia permaneceram altas por mais de um dia. Provavelmente isto ocorreu devido a este tipo de estímulo ter sido de maior intensidade quando comparado com o estímulo provocado pela baixa dose de ACTH do desafio.

5.3 Progestinas, andrógenos e estrógenos

Somente a fêmea Ilha (Gráfico 9) apresentou picos para os estrógenos (dias 1, 4 e 5), para os andrógenos (dia 4) e para as progestinas (dia 1 e 4). Foi interessante observar no perfil deste animal uma certa sincronia entre os três metabólitos. Entretanto, a fêmea Jussara (Gráfico 8) apresentou no seu perfil uma forte tendência de pico para as progestinas (32.270,16 ng/g fezes úmidas). Neste caso o pico seria considerado para valores iguais ou superiores a 33.511,68 ng/g fezes úmidas.

O animal controle Pig (Gráfico 10) apresentou um pico para andrógenos e um pico para estrógenos no dia zero, valores estes aparentemente inexplicáveis. Mas após o desafio com ACTH não houve nenhum indício de pico.

No perfil do animal Foz a concentração dos andrógenos nos dias após o desafio com ACTH continuou sendo mais elevada que as concentrações dos demais hormônios, corroborando com as informações de Nelson (1999) que sugeriu uma concentração mais alta de andrógenos secretada pela adrenal em machos. Por um outro lado, a concentração dos andrógenos na fêmea Ilha foi a mais elevada dentre todos os metabólitos mensurados deste animal, sugerindo que podem ocorrer exceções. Ressalta-se que na fêmea Jussara isto não ocorreu. Entretanto, sendo apenas um macho e uma fêmea, foi difícil concluir-se algo neste sentido.

Discutindo-se apenas a questão das progestinas nos perfis das fêmeas, já que esta foi uma das propostas deste trabalho (mesmo que alternativamente), observou-se que estes tendem a apresentar picos após a administração do ACTH, diferentemente do que ocorreu no caso do macho. Novamente o número reduzido de animais impede uma conclusão mais efetiva. Pode-se notar que sempre houve uma elevação nas concentrações das progestinas um dia após o dia de administração do ACTH. Comprovar este fato e a fonte originária do hormônio somente seria

possível com animais ovariosalpingohisterectomizados, o que é impossível de se proceder em animais ameaçados de extinção. Mas um dado que reforça essa teoria foi a correlação entre as progestinas mensuradas com o anticorpo CL 425 e os metabólitos de glicocorticóides das fêmeas mensurados com o conjunto comercial ICN (o de melhor desempenho), que foi na ordem de 0,69 ($p= 0,0015$). Apesar de não haver uma correlação muito forte, ela foi significativa. Ressalta-se que no experimento do desafio com ACTH sempre houve picos de metabólitos de glicocorticóides após a administração deste fármaco. Van Lier et al. (1998) presumiu que a produção de progesterona tem uma alta dependência na produção do cortisol, visto que a própria progesterona é um dos esteróides precursores do próprio cortisol e que este e seus precursores seriam liberados simultaneamente quando estimulados pelo ACTH. Fajer, Holzbauer e Newport (1971) também suportaram essa hipótese.

Outra questão que deve ser levada em consideração foi o fato de ter se mensurado os metabólitos fecais da progesterona. Todos os artigos revisados realizaram seus estudos com mensurações plasmáticas da própria progesterona, e não de maneira indireta por meio dos seus metabólitos. Assim sendo, é possível que a via preferencial de detecção da progesterona de origem adrenal seja a sérica, já que nesta matriz o hormônio encontra-se estruturalmente completo e a técnica para detectá-lo nesta forma é mais apurada e sensível. Outra possibilidade seria aumentar a dose de ACTH injetado. A escolha da dose de 100 UI foi preconizada segundo a teoria da precaução. Como são animais de interesse conservacionista, optou-se em utilizar a dose mais baixa para evitar-se imprevistos. Outro parâmetro utilizado foi o peso corpóreo da jaguatirica. Em estudos sobre o monitoramento não invasivo do estresse, guepardos (*Acinonyx jubatus*) receberam 400 UI de ACTH (TERIO; CITINO; BROWN, 1999), panteras-nebulosas (*Neofelis nebulosa*) receberam 500 UI de ACTH e cachorros-selvagens-africanos (*Lycan pictus*) receberam 400 UI de ACTH. Tanto o peso dos guepardos quanto o dos cachorros-

selvagens superam em muito o peso de uma jaguatirica. Já o peso das fêmeas da pantera nebulosa é um pouco superior ao das jaguatiricas, enquanto que o peso dos machos é duas vezes superior. Outros artigos relataram que hienas pintadas (*Crocota crocuta*) foram injetadas com 50 UI de ACTH (GOYMANN et al., 1999), porcas também foram injetadas com 50 UI (TSUMA et al., 1998) e cervos-dama (*Dama dama*) com 100 UI (ASHER; PETERSON; DUGANZICH, 1989). Salienta-se também que o principal objetivo deste experimento era obter picos de metabólitos de glicocorticóides após o desafio, o que foi efetivamente atingido com a dose de 100 UI. Portanto é possível que em um futuro estudo com este único objetivo se possa obter picos de progestinas por meio do aumento da dose do ACTH.

Como na maioria dos felídeos a ovulação é induzida por um estímulo decorrente de uma situação aguda de estresse gerada na cópula, é possível presumir que a progesterona produzida pela adrenal neste momento desempenhe um importante papel no evento da liberação dos oócitos. Entretanto, em casos de estresse crônico, a progesterona produzida pela adrenal provavelmente possui uma ação deletéria na reprodução, atuando negativamente na secreção pulsátil de LH. A progesterona produzida pela adrenal de ratas teve grande influência no seu ciclo estral, já que foi secretada em altas concentrações (FAJER; HOLZBAUER; NEWPORT, 1971). Piva et al. (1973) reforçou esta idéia, concluindo que em ratas o aumento da liberação da progesterona da adrenal no dia proestro pôde facilitar a liberação de quantidades ovulatórias de LH e desencadear o comportamento de cópula. Este mesmo autor também colocou que as concentrações de progesterona da adrenal na circulação sistêmica são similares em ambos os sexos e que o ACTH não controla exclusivamente a produção desta progesterona, mas que outros hormônios como a prolactina, LH e GH (hormônio do crescimento) também exerceram um importante papel neste mecanismo dos ratos. Seguindo esta mesma linha, Asher, Peterson e Duganzich (1989) descobriram que em situações de estresse extremo, cervos dama (*Dama dama*)

produziram altas concentrações de progesterona oriunda da adrenal e que isto aparentemente inibiu a onda pré-ovulatória de LH no início do estro. Estes autores fizeram outra interessante inferência, a de que a grande concentração de progesterona produzida pela adrenal pode ocasionalmente confundir a interpretação dos perfis de progesterona plasmática em algumas espécies de veados. Essa é uma importante informação que deveria ser considerada no estudo do ciclo estral por meio da mensuração de hormônios esteróides em animais que estiverem sob condições adversas de cativeiro. Outra participação da progesterona produzida pela adrenal dentro de uma estratégia reprodutiva ocorreu quando cervos-de-cauda-branca em períodos de estresse tiveram a prenhez mantida pela neutralização da ação abortiva do cortisol pela própria progesterona, e na inibição da fase estral e da ovulação durante a época reprodutiva para prevenir a prenhez em condições extremas de estresse (PLOTKA et al., 1983) .

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Para a extração de metabólitos de glicocorticóides fecais de jaguatiricas, é indiferente utilizar a técnica descrita por Wasser et al. (1994) ou por Schwarzenberger et al. (1991), já que desempenho das duas é muito semelhante.

O conjunto comercial “ImmuChem Double Antibody Corticosterona ^{125}I RIE” da ICN “Biomedicals” teve um desempenho muito superior na mensuração dos metabólitos de glicocorticóides das fezes de jaguatiricas quando comparado com o conjunto comercial “Coat-a-count Cortisol ^{125}I RIE” da DPC, sendo validado fisiologicamente. Assim sendo, a sua utilização para esta finalidade deve ser preconizada.

Existem fortes indícios da produção de progesterona pela adrenal de jaguatiricas submetidas ao desafio com ACTH.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- 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.
- BOLAÑOS, J. M.; MOLINA, J. R.; FORSBERG, M. Effect of blood sampling and administration of ACTH on cortisol and progesterone levels in ovariectomized zebu cows (*Bos indicus*). **Acta Veterinaria Scandinavia**, v. 38, p. 1-7, 1997.
- BOORD M.; GRIFFIN, C. Progesterone secreting adrenal mass in a cat with clinical signs of hyperadrenocorticism. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 214, n. 5 p. 666-669, 1999.
- BROWN, J. L.; TERIO, K. A.; GRAHAM, L. H. Fecal androgen metabolites analysis for non invasive monitoring of testicular steroidogenic activity in felids. **Zoo Biology**, v. 15, p. 425-434, 1996.
- CHATDARONG, K.; PONGLOWHAPAN, S.; KARLSSON, A.; LINDE-FORSBERG, C. Exogenous ACTH induced progesterone levels in female domestic cats. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CANINE AND FELINE REPRODUCTION, "BASIC AND APPLIED RESEARCH ON DOMESTIC, EXOTIC AND ENDANGERED CARNIVORES", 5., 2004, São Paulo. **Abstract...** p. 182-185.
- DOBSON, H.; ESSAWY, S. A.; ALAM, M. G. S. Suppression of LH response to gonadotrophin-releasing hormone or oestradiol by ACTH (1-24) treatment in anoestrus ewes. **Journal of Endocrinology**, v. 118, p. 193-197, 1988.
- DOBSON, H.; SMITH, R. F. Stress and reproduction in farm animals. **Journal of Reproduction and Fertility - Supplement**, v. 49, p. 451-461, 1995.
- FAJER, A. B.; HOLZBAUER, M.; NEWPORT, H. M. The contribution of the adrenal gland to the total amount of progesterone produced in the female rat. **Journal of Physiology**, v. 214, p. 115-126, 1971.
- FERIN, M. Stress and the reproductive cycle. Clinical review 105. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 84, n. 6, p. 1768-1774, 1999.
- FOWLER, M. E. Stress. In: _____. **Zoo and Wild Animal Medicine**. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1986. p. 34-35.
- GOYMANN, W.; MÖSTL, E.; VAN'T HOF, T.; EAST, M. L.; HOFER, H. Noninvasive fecal monitoring of glucocorticoids in spotted hyenas, *Crocuta crocuta*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 114, p. 340-348, 1999.

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

GRAHAM, L. H.; BROWN, J. L. Non-invasive assessment of gonadal and adrenocortical function in felid species via fecal steroid analysis. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF PHYSIOLOGY AND ETHOLOGY OF WILD AND ZOO ANIMALS, 1., Berlim. **Proceedings...** p. 18-21, 1996b.

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

IUDZG/CBSG. International Union Zoological and Botanical Garden/International Specialist Group for Nature Conservation. **The world zoo conservation strategy: the role of the zoos and aquaria of the world in global conservation**. Chicago: Zoological Society, 1993, 76 p.

LISTA NACIONAL DAS ESPÉCIES DA FAUNA BRASILEIRA AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO. **Publicação eletrônica**. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), Ministério do Meio Ambiente (MMA) Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/sbf/fauna/>>. Acesso em: 12 jul.2005.

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

MONFORT, S. L.; MASHBURN, K. L.; BREWER, B. A.; CREEL, S. R. Evaluating adrenal activity in african wild dogs (*Lycaon pictus*) by fecal corticosteroids analysis. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 29, n. 2, p. 129-133, 1998.

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

NELSON, R. J. Stress. In: _____. **An introduction to behavioral endocrinology**. 2. ed. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., 1999. p. 558-591.

NOGUEIRA, G. P.; SILVA, J. C. R. Plasma cortisol levels in captive wild felines after chemical restraint. **Brazilian Journal of Medicine and Biological Research**, v. 30, p. 1359-1361, 1997.

OLIVEIRA, T. G.; CASSARO, K. *Leopardus pardalis*. In: _____. **Guia de identificação de felinos brasileiros**. 2. ed. São Paulo: Sociedade dos Zoológicos do Brasil. p. 17-19, 1999.

PARKES, A. S. Relation between the gonads and the adrenal glands. In: _____. **Marshall's physiology of reproduction**. 3. ed. London: Longman, Green and Co Ltda., 1966. p. 1064-1099.

PAZ, R. C. R. **Bioteecnologias da reprodução utilizadas como ferramentas auxiliares no manejo e conservação de duas espécies de felinos selvagens: *Leopardus pardalis* e *Leopardus***

tigrinus. 2004. 167 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

PIVA, F.; GSGLISNO, P.; MOTTA, M.; MARTINI, L. Adrenal progesterone: factors controlling its secretion. **Endocrinology**, v. 93, p. 1178-1184, 1973.

PLOTKA, E. D.; SEAL, U. S.; VERME, L. J.; OZOGA, J. J. The adrenal gland in whit-tailed deer: a significant source of progesterone. **Journal of Wildlife Management**, v. 47, p. 38-44, 1983.

RIVIER, C.; RIVEST, S. Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. **Biology of Reproduction**, v.45, p. 523-532, 1991.

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

SCHOEMAN, J. P.; EVANS, H. J.; CHILDS, D.; HERRTAGE, M. E. Cortisol response to two different doses of intravenous synthetic ACTH (tetracosactrin) in overweight cats. **Journal of Small Animal Practice**, v. 41, p. 552-557, 2000.

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

TERIO, K. A.; CITINO, S. B.; BROWN, J. L. Fecal cortisol metabolite analysis for noninvasive monitoring of adrenocortical function in the cheetah (*Acinonyx jubatus*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 30, n. 4, p. 484-491, 1999.

TSUMA, V. T.; EINARSSON, S.; MADEJ, A.; FORSBERG, M.; LUNDEHEIM, N. Plasma levels of progesterone and cortisol after ACTH administration in lactating primiparous sows. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 39, p. 71-76, 1998.

VAN LIER, E.; ANDERSSON, H.; CLARIGET, R. P.; FORSBERG, M. Effects of administration of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) on extragonadal progesterone levels in sheep. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 33, p. 55-59, 1998.

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

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

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

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

ANEXO A

Protocolo Conjunto Comercial Corticosterona (ICN) / radioimunoensaio:

1) Adicionar 0,1 mL do diluente esteróide nos tubos NSB (Reação não específica); 2) adicionar 0,1 mL do diluente esteróide nos tubos “zeros”; 3) adicionar 0,1 mL dos calibradores da curva padrão (25 ng/mL-1000 ng/mL); 4) adicionar 0,1 mL dos controles da amostras no restante dos tubos; 5) adicionar 0,2 mL do ^{125}I corticosterona (reagente azul) em todos os tubos; 6) adicionar 0,2 mL do anti-corticosterona (reagente amarelo) em todos os tubos exceto nos NSB; 7) agitar todos os tubos e incubar a temperatura ambiente (22°-25 °C) por duas horas; 8) após a incubação, adicionar 0,5 mL da solução precipitante em todos os tubos; 9) agitar os tubos; 10) centrifugar todos os tubos a 1000G por 15 min. 11) aspirar ou decantar o sobrenadante; 12) contar o precipitado em um contador gamma.

Protocolo Conjunto Comercial Cortisol (DPC) / radioimunoensaio:

1) Tubos lisos: rotular quatro tubos de polipropileno lisos com T (contagens totais) e NSB (ligação não específica) em duplicata; Tubos revestidos: rotular em duplicata doze tubos revestidos com anticorpos de cortisol para a curva padrão, e o restante para os controles e amostras; 2) Pipetar 25 μL do calibrador zero A para os tubos NSB e tubo A e pipetar 25 μL de cada calibrador restante, controles e amostras nos tubos preparados; 3) adicionar 1,0 mL de cortisol ^{125}I a cada tubo. Agitar; 4) Incubar durante 45 min. a 37°C; 5) decantar completamente, exceto os tubos T; 6) contar durante um minuto no contador gamma.

**Protocolo Progestinas (P4 adquirido de C. Munro - UC Davis, CL425) /
enzimaimunoensaio:**

No primeiro dia pegar 16,6 μL do anticorpo e adicionar 4,984 mL do Tampão EIE de Aderência. Adicionar à placa 50 μL dessa solução por poço. Selar e deixar refrigerado “overnight”. No outro dia diluir os extratos fecais (jaguatirica 1:300) e preparar os padrões. Adicionar 5 μL do padrão com 495 μL do Tampão EIE, adicionar 5 μL da solução anterior com 495 μL do Tampão EIE para gerar 500 pg/poço (por 50 μL). Fazer diluições seriadas 1:1 para os padrões de 500 pg/poço até 3,9 pg/poço. Preparar o Conjugado HRP adicionando 50 μL deste conjugado a 4,95 mL de Tampão EIE (para toda placa). Lavar a placa cinco vezes e secar em papel absorvente batendo vigorosamente contra este. Adicionar as amostras e os padrões aos poços em duplicata. Adicionar 50 μL do Tampão EIE na placa para os controles e NSB, 50 μL dos padrões (500 até 3,9 pg/poço) nas duas primeiras colunas, 50 μL dos controles alto e baixo, 50 μL de cada amostra e 50 μL do conjugado em cada poço, tudo em duplicata. Cobrir a placa e agitar por duas horas. Retirar o Tampão Citrato do refrigerador e mantê-lo a temperatura ambiente. Lavar novamente a placa cinco vezes e ao final batê-la vigorosamente contra o papel toalha. Adicionar os substratos: preparar o ABTS – 11 mL de Tampão Citrato adicionado a 110 μL de ABTS e 2 μL de H_2O_2 . Adicionar 100 μL desta solução por poço. Cobrir a placa com papel laminado e agitar por 30 min. para revelar a cor. Ler a placa em um contador de densidade ótica.

Protocolo Estrógenos (E2 adquirido de C. Munro - UC Davis, R4972) / enzimaimunoensaio:

No primeiro dia pegar 66,6 μL do anticorpo e adicionar 4,884 mL do Tampão EIE de Aderência. Adicionar à placa 50 μL dessa solução por poço. Selar e deixar refrigerado “overnight”. No outro dia lavar a placa cinco vezes e secar em papel absorvente batendo

vigorosamente contra este; bloquear a placa adicionando 50µL do Tampão EIE em todas os poços e agitar por 2-4 horas; diluir os extratos fecais (jaguatirica 1:300) e preparar os padrões. Adicionar 120µL do padrão (2000pg/poço) com 120µL do Tampão EIE gerando 1000pg/poço. Fazer diluições seriadas 1:1 para os padrões de 250 pg/poço até 3,9 pg/poço. Preparar o Conjugado HRP adicionando 50 µL deste conjugado a 4,95 mL de Tampão EIE (para toda placa). Lavar a placa cinco vezes e secar em papel absorvente batendo vigorosamente contra este. Adicionar as amostras e os padrões aos poços em duplicata. Adicionar 20µL do Tampão EIE na placa para os controles e NSB, 20µL dos padrões (250 até 3,9 pg/poço) nas duas primeiras colunas, 20µL dos controles alto e baixo, 20 µL de cada amostra e 50 µL do conjugado em cada poço, tudo em duplicata. Cobrir a placa e agitar por duas horas. Retirar o Tampão Citrato do refrigerador e mantê-lo a temperatura ambiente. Lavar novamente a placa cinco vezes e ao final batê-la vigorosamente contra o papel toalha. Adicionar os substratos: preparar o ABTS – 11 mL de Tampão Citrato adicionado a 110 µL de ABTS e 2 µL de H₂O₂. Adicionar 100µL desta solução por poço. Cobrir a placa com papel laminado e agitar por uma hora para revelar a cor. Ler a placa em um contador de densidade ótica.

**Protocolo Andrógenos (T adquirido de C. Munro - UC Davis, R156/7) /
enzimaimunoensaio:**

No primeiro dia pegar 50 µL do anticorpo e adicionar 9,95 mL do Tampão EIE de Aderência. Adicionar à placa 100µL dessa solução por poço. Selar e deixar refrigerado “overnight”. No outro dia diluir os extratos fecais (jaguatirica 1:300) e preparar os padrões. Adicionar 50 µL do padrão com 2,45mL do Tampão EIE para gerar 200 pg/poço (por 100µL). Fazer diluições seriadas 1:1 para os padrões de 200 pg/poço até 3,125 pg/poço. Lavar a placa

cinco vezes e secar em papel absorvente batendo vigorosamente contra este. Adicionar as amostras e os padrões aos poços em duplicata. Adicionar 100 μ L do Tampão EIE na placa para os controles e NSB, 100 μ L dos padrões (200 até 3,125 pg/poço) nas duas primeiras colunas, 100 μ L dos controles alto e baixo e 100 μ L de cada amostra. Selar e deixar refrigerado “overnight” sem adicionar o HRP. No terceiro dia preparar o Conjugado HRP adicionando 8,3 μ L deste conjugado a 4,992 mL de Tampão EIE (para toda placa). Adicionar 50 μ L do conjugado em cada poço que contenha as amostras e os padrões, tudo em duplicata. Incubar sob refrigeração por 2 horas. Lavar a placa cinco vezes e secar em papel absorvente batendo vigorosamente contra este. Adicionar os substratos: preparar o ABTS – 11 mL de Tampão Citrato adicionado a 110 μ L de ABTS e 2 μ L de H₂O₂. Adicionar 100 μ L desta solução por poço. Cobrir a placa com papel laminado e agitar por 30 min. para revelar a cor. Ler a placa em um contador de densidade ótica.