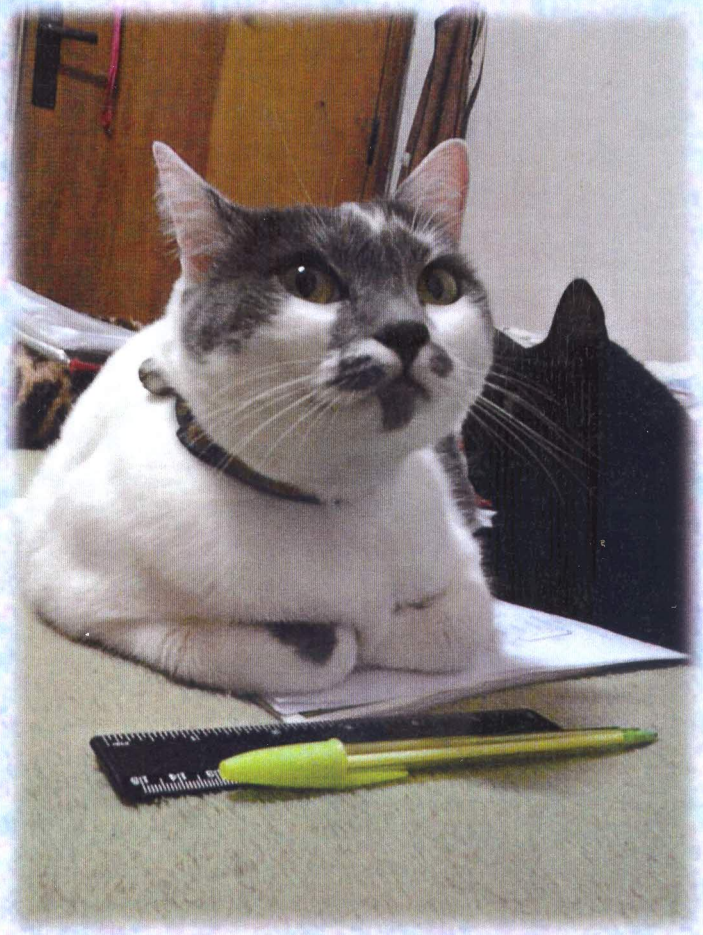
PRISCILA LUZIA FRAGOSO

Métodos de imunoensaio não radiométricos – Enzimaimunoensaio (EIA) – e radiométricos -Radioimunoensaio (RIA) - na avaliação dos metabolitos fecais de glicocorticóides em gatos domésticos que vivem sozinhos e em pequenas colônias



São Paulo
2013

PRISCILA LUZIA FRAGOSO

Métodos de imunoensaio não radiométricos - enzimaimunoensaio (EIA) – E radiométricos -Radioimunoensaio (RIA) - Na avaliação dos metabólitos fecais de glicocorticoides em gatos domésticos que vivem sozinhos e em pequenas colônias

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clinica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre em Ciências

Departamento

Clínica Médica

Área de Concentração

Clínica Veterinária

Orientador

Prof. Dr. Archivaldo Reche Junior

São Paulo

2013

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2824
FMVZ

Fragoso, Priscila Luzia
Métodos de imunoensaio não radiométricos – enzimaimunoensaio (EIA) – e radiométricos – radioimunoensaio (RIA) – na avaliação dos metabólitos fecais de glicocorticoides em gatos domésticos que vivem sozinhos e em pequenas colônias / Priscila Luzia Fragoso. -- 2013.
99 f : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clinica Médica, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Clinica Veterinária.

Área de concentração: Clinica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Archivaldo Reche Junior.

1. Felino. 2. Radioimunoensaio. 3. Enzimaimunoensaio. 4. Cortisol. 5. Fecal. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Métodos de imunoensaio não radiométricos – Enzimaimunoensaio (EIA) – e radiométricos – Radioimunoensaio (RIA) – na avaliação dos metabólitos fecais de glicocorticoides em gatos domésticos que vivem sozinhos e em pequenas colônias.", protocolado sob o nº 2072/2010, utilizando 140 (cento e quarenta) gatos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Archivaldo Reche Junior, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 24/11/2010.

We certify that the Research "Immuneassay non radiometric – enzyme immuneassay (EIA) – and radiometric – Radioimmunoassay RIA) methods – evaluation of faecal glucocorticoids metabolites in single housed cats and catsfrom small colonies", protocol number 2072/2010, utilizing 140 (one hundred and forty) cats, under the responsibility Prof. Dr. Archivaldo Reche Junior, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 11/24/2010.

São Paulo, 10 de junho de 2013

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: FRAGOSO, Priscila Luzia

Título: Métodos de imunoensaio não radiométricos – enzimaimunoensaio (EIA) – e radiométricos – radioimunoensaio (RIA) – na avaliação dos metabolitos fecais de glicocorticoides em gatos domésticos que vivem sozinhos e em pequenas colônias

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

“Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine.
E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.
E ainda que distribuísse toda a minha fortuna para sustento dos pobres, e ainda que entregasse o meu corpo para ser queimado, e não tivesse amor, nada disso me aproveitaria.
O amor é sofredor, é benigno; o amor não é invejoso; o amor não trata com leviandade, não se ensoberbece.
Não se porta com indecência, não busca os seus interesses, não se irrita, não suspeita mal;
Não folga com a injustiça, mas folga com a verdade;
Tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta.”
1 Coríntios 13:1-7

DEDICATÓRIAS

...Aquele que formou todas as coisas, e por Ele todas as coisas foram criadas. Obrigada por mais uma etapa concluída. Sem você, Jesus, eu nada seria;

....a minha querida e amada mãe, Maria Judit, por todas as horas compartilhadas, pelas madrugadas em que fomos pegar o fretado, pelo ombro mais que amigo, amado. Por toda a sua dedicação e carinho. Esta tese é sua!!

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai pela vida, por tantos ensinamentos, e por contribuir para eu ser quem sou.

Ao prof Valdo pela confiança, pelos conselhos, pela ajuda e pela orientação, não só neste trabalho mas também em muitos “casos difíceis” de resolver.

Ao meu querido avô Thomaz Serafin Nunes (*in memorian*) por ter me ajudado a não desistir. Levo sua lição sempre comigo.

A minha família - meus avós (Thomaz (*in memorian)*, Rosa (*in memorian*),Irene e Dionisio), meus tios Clara, Fernando e Lino , por todo o apoio e orações em horas muitos difíceis em toda a minha vida. Ao meu primo Nilton pelo incentivo sempre. Aos meus priminhos Guilherme e Fernandinha por alegrarem nossa vida.

Ao meu tio Alcir, por quem tenho muito carinho e admiração.

Ao meu querido e amado namorado, Ricardo Quaresma Moura, que vem dividindo momentos muito felizes ao meu lado. Muito obrigada por todo o seu apoio e força todos esses dias um tanto sombrios, e por tê-los tornado mais coloridos!

A Melissa, que veio ser a “cereja do nosso bolo!”

A minha amiga Dani, pelos conselhos, pelas palavras de apoio, pelo ombro amigo, pela orientação nos projetos, pelos ensinamentos. Por sua amizade!

As amigas e amigos que foram sendo construídos durante a longa jornada – Arine Pelegrino, Alexandre Daniel, Carlos Geraldo, Juliana Bovino, Juliana Citadela, Juliana Riemma, Luciana Ohara, Fernanda Sati, Rosmeire, Fabio Baltazar, Rodrigo Alves, Raphael Esteves, Rafael Nunes, Débora Mendonça, Larissa, Claudinha, Silvia Monteiro, Janis Oliva, Dani Passareli, Andreza Avila, Ricardo Henrique dos Santos Silva, Cristiane Morais, Polianna Claus, Luana Battaglia, Simone Matheus, Samara Mateiro, Álvaro Soares, Sandro Menezes, Cida..... pelas horas compartilhadas, pelas risadas e por todo o apoio!

As meninas do apartamento três – Larissa e Ana Paula – pelas muitas risadas, pelo apoio e pela acolhida. Pela amizade!

A Luli, Pretinha, Mione, Fukushima, Dalila e ao Chocolate por me darem muito mais que ofereço a vocês. Por todas as horas passadas juntos estudando. Por cada miadinho ou abanar da cauda. Eu amo muito vocês e agradeço por existiram em minha vida.

Aos professores do departamento de Clínica Médica, que foram sempre prontos em me ajudar, incluindo em situações inusitadas, como ficar trancada no corredor do prédio.

As meninas queridas do laboratório – Clara, Claudia, Dinha, Creide, Mau, Maria Helena e Samantha, muito obrigada por tudo que vocês fizeram por mim e por todo o projeto.

Ao pessoal da psicologia USP, profa. Ema, profa. Patricia, Marie Odile e Gisele, que cederam o uso do laboratório e pelas dicas em todo o projeto.

Ao prof Rupert Palm e a Edith, que foram extremamente gentis durante toda a estadia em Viena, além do excelente trabalho executado.

As outras "valdetes" (orientadas do prof Valdo) – Dani, Marcela, Viviana, Adriana e Mariana – obrigada pela ajuda, pelos almoços, pelas risadas e pela companhia.

A equipe do VRA e ao laboratório de dosagens hormonais, em especial a Priscila Viau e ao prof^{o}. Claudio Alvarenga. Obrigada pela disponibilização do laboratório e por todo auxilio dado.

A Carine, que realizou a analise estatística desse trabalho de uma forma brilhante.

As meninas da secretaria do departamento – Cida, Adelaide, Carol e Silvana, pelas dicas e ajudas prestadas.

As meninas da biblioteca, por me ajudarem as colocar as "coisas em ordem"!

Aos proprietários que foram peça chave no trabalho.

E a todos os gatinhos que doaram "seu cortisol" para que o esse projeto fosse desenvolvido.

RESUMO

FRAGOSO, P. L. **Métodos de imunoensaio não radiométricos - enzimaimunoensaio (EIA) – E radiométricos -Radioimunoensaio (RIA) - Na avaliação dos metabólitos fecais de glicocorticoides em gatos domésticos que vivem sozinhos e em pequenas colônias**. [Immuneassay non radiometric – Enzime immuneassay (EIA) and radiometric – Radioimmune assay (RIA) methods – evaluation of faecal glucocorticoids metabolites in singles housed cats and cats from small colonies]. 2013. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A avaliação dos níveis de estresse nos animais tem importância tanto na área médica, econômica e de bem-estar, assim estudos vem sendo cada vez mais difundidos neste quesito. Os gatos são animais de companhia que tem progressivamente conquistado espaço no mundo moderno, dessa forma vem sendo mais observados e estudados, demonstrando-se bem mais sociais do que anteriormente se acreditava. Zelar pela qualidade de vida dos mesmos é dever do veterinário, e não somente pela questão médica em si mas também pelo bem-estar, já que se sabe, por exemplo, que condições estressantes podem levar a alterações orgânicas deletérias. A mensuração do cortisol, ou de seus metabólitos, tem sido utilizada para avaliar de forma fisiológica o bem-estar dos animais, tanto domésticos quanto selvagens. As técnicas para tal mensuração também vem sendo aperfeiçoadas, buscando-se assim ensaios mais precisos, seguros e baratos. No presente trabalho pretendemos comparar quantitativamente e qualitativamente dois imunoensaios – radioimétrico (radioimunoensaio) e enzimático (enzimaimunoensaio) - utilizando amostras fecais de gatos domiciliados que vivem sozinhos ou em pequenas colônias. Sua importância deve-se ao uso de uma nova técnica, mais barata e segura, porém ainda pouco difundida no nosso país.

Palavras-chave: Felino. Radioimunoensaio. Enzimaimunoensaio. Cortisol. Fecal.

ABSTRACT

FRAGOSO, P. L. **Immuneassay non radiometric – Enzime immuneassay (EIA) and radiometric – Radioimmune assay (RIA) methods – evaluation of faecal glucocorticoids metabolites in singles housed cats and cats from small colonies** [Métodos de imunoensaio não radiométricos - enzimaimunoensaio (EIA) – E radiométricos -Radioimunoensaio (RIA) - Na avaliação dos metabólitos fecais de glicocorticoides em gatos domésticos que vivem sozinhos e em pequenas colônias]. 2013. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Evaluation of stress levels among animals has both medical and welfare importance and studies regarding this matter have been increasingly published. Cats are companion animals achieving a special position within modern societies – they have been carefully observed and studied thus demonstrating that they are much more social than previously thought. Taking care of cats´ life quality is a veterinarian duty not only because it constitutes a medical issue per se but also due to its welfare implications: it is well known, for instance, that stressful conditions can lead to deleterious organic diseases. Measurement of cortisol levels (or its metabolites) has been used as a physiological parameter for investigating the welfare of both domestic and wild animals. Laboratory techniques used for such measurements have been under improvement in order to achieve more precise, safe and cheap assays. In the present study we aim at comparing quantitatively two assays – radioimmunoassay and enzyme immunoassay – by using domestic cats faecal samples (single and in-group housed cats). The relevance of this study lays on the use of a pioneering technique, cheap and safe, besides the establishment of a scientific cooperation with a leading university´s laboratory – one of the few existing which deals with faecal hormonal dosages.

Keywords: Feline. Radioimmunoassay. Enzimeimmunoassay. Cortisol. Faecal.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição dos animais dentro dos grupos segundo o sexo, idade, definição racial e status sexual.....41

Tabela 2- Percentual de reação cruzada do conjunto diagnóstico comercial para radioimunoensaio-Double Antibody Corticosterone ImmuChemTM, MP Biomedicals, LLC.....45

Tabela 3- Medidas descritivas do Cortisol - RIA segundo o grupo e o teste, obtido no modelo de efeitos aleatórios para o logaritmo de RIA.....54

Tabela 4- Medidas descritivas do Cortisol – RIA de acordo com características demográficas e do teste obtido no modelo de efeitos aleatórios para o logaritmo de RIA..... 55

Tabela 5- Medidas descritivas do Cortisol - EIA de acordo com grupo e teste obtidos no modelo de efeitos aleatórios para o logaritmo da EIA.....60

Tabela 06 -Medidas descritivas da variável DP_EIA obtida de acordo com o grupo e teste obtido no modelo de efeito aleatório para o logaritmo DP_EIA.....60

Tabela 7 - Medidas descritivas do Cortisol - EIA de acordo com características demográficas e do teste obtido no modelo de efeitos aleatórios para o logaritmo de EIA 61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema representativo do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e suas respostas frente ao estresse agudo e crônico.....24

Figura 2- Esquema representativo das vias metabólicas dos glicocorticoides.....27

Figura 3- Diagrama do radioimunoensaio.....30

Figura 4 - Evaporador giratório tipo Speed Vac 43

Figura 5- Preparação das amostras após ressuspensão.....47

Figura 6- Parte do parque de equipamentos utilizados no processo de EIA Universidade de Viena..... 47

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Valores de mediana para a dosagem por RIA de metabólitos de cortisol (ug/g fezes secas) em amostras fecais de gatos que vivem sozinhos.....51

Gráfico 2 – Valores de mediana para a dosagem por RIA de metabólitos de cortisol (ug/g fezes secas) em amostras fecais de gatos que vivem em duplas.....52

Gráfico 3 – Valores de mediana para a dosagem por RIA de metabólitos de cortisol (ug/g fezes secas) em amostras fecais de gatos que vivem em trios e/ou quartetos.....53

Gráfico 4 - Valores médios de GCM – com desvio padrão- dentro dos grupos- radioimunoensaio.....54

Gráfico 5- Valores de GCM médios e desvio padrão alocados pela divisão em grupos – Radioimunoensaio.....56

Gráfico 6– Valores de mediana para a dosagem por EIA de metabólitos de cortisol (ηg/g fezes secas) em amostras fecais de gatos que vivem sozinhos.....57

Gráfico 07 – Valores de mediana para a dosagem por EIA de metabólitos de cortisol (ηg/g fezes secas) em amostras fecais de gatos que vivem em duplas.....58

Gráfico 08 – Valores de mediana para a dosagem por EIA de metabólitos de cortisol (ηg/g fezes secas) em amostras fecais de gatos que vivem em trios e/ou quartetos.....59

Gráfico 9 – Valores de GCM por enzimaimunensaio –média e desvio padrão dos animais alocados em grupos e comparados quanto a idade.....62

Gráfico 10- Correlação entre valores de glicocorticoides através do EIA e idade em meses 63

Gráfico 11- Avaliação da relação entre as duas medidas de metabólitos de glicocorticóides fecais (EIA x RIA).....64

Gráfico 12 – Correlação entre RIA e EIA mensuradas de acordo com o sexo – fêmeas.....65

Gráfico 13– Correlação entre RIA e EIA mensuradas de acordo com o sexo – machos.....65

LISTA DE APÊNDICES E ANEXOS

Apêndice A - Cartaz de recrutamento para o projeto.....86

Apêndice B - Correspondência eletrônica – convite para participação no projeto 87

Apêndice C - Ficha de recrutamento – “Check in”..... 88

Apêndice D – Ficha de acompanhamento do período de coletas – “Check Out”.....89

Anexo A - Protocolo EIA – Universidade de Viena 90

SÚMARIO

1**INTRODUÇÃO.**.....20

2 **REVISÃO DE LITERATURA.**.....22

2.1 DEFINIÇÃO DE ESTRESSE.....22

2.2 FISIOLOGIA DO ESTRESSE.....23

2.3 MENSURAÇÃO DOS GLICOCORTICOIDES.....28

2.4 PRESENTE PESQUISA.....35

3 **MATERIAL E MÉTODOS**.....38

3.1 LOCAL 38

3.2 ANIMAIS 38

3.3 COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS.....41

3.4 FRACIONAMENTO E LIOFILIZAÇÃO 42

3.5 EXTRAÇÃO DOS METABÓLTIOS DE GLICOCORTICOIDES FECAIS.....43

3.6 DOSAGEM HORMONAL DOS METABÓLITOS DE GLICOCORTICOIDES.. 44

3.6.1 **Radioimunoensaio**.....44

3.6.2 **Enzimaimunoensaio**.....46

3.7 ANALISES ESTATÍSTICAS.....48

4 **RESULTADOS**.....50

4.1 RADIOIMUNOENSAIO.....51

4.1.1 **Grupo I** 51

4.1.2 **Grupo II**.....52

4.1.3 **Grupo III**.....53

4.2 ENZIMAIMUNOENSAIO.....57

4.2.1 **Grupo I**.....57

4.2.2 **Grupo II**.....58

4.2.3 **Grupo III**.....59

4.3 RADIOIMUNOENSAIO VERSUS ENZIMAIMUNOENSAIO.....64

5 **DISCUSSÃO**.....67

5.1 RADIOIMUNOENSAIO VERSUS ENZIMAIMUNOENSAIO.....67

5.2 RADIOIMUNOENSAIO.....70

5.3 ENZIMAIMUNOENSAIO.....73

6 **CONCLUSÃO**.....78

REFERENCIAS.....80

APÊNDICES.....86

ANEXOS.....90

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A clinica de felinos vem ganhando destaque a cada dia. Os gatos, antes considerados apenas “amantes da casa” e não do proprietário, vem dando demonstrações de que esse conceito está equivocado. Isto decorria da ideia de que se tratava de uma espécie solitária (BEAVER, 2005), entretanto estudos mais recentes o consideram um animal social (CROWEL-DAVIS 2004), apresentando afiliações tanto com seus interespecíficos (EDWARDS et al., 2007) como com os intraespecíficos (MCDONALD el at., 1987, CROWEL-DAVIS 2004). Entretanto é importante saber se estas interações são benéficas e uma ferramenta útil pata tal é o conhecimento da neuroendocrinologia comportamental, que é a interação entre o comportamento e a função endócrina presente em todos os vertebrados (COCKREM, 2005).

Existem dois principais eixos responsáveis pelas respostas frente ao estresse (veremos em mais detalhes adiante), e ambos culminam na glândula adrenal, que tem como produto a produção de glicocorticoides, principalmente o cortisol e a corticosterona. A mensuração dos mesmos tem sido utilizada para investigar a atividade adrenocortical durante a exposição a estímulos estressores, como mudanças de ambiente, transporte, tensão social, agressão, interação humana, exposição a predadores, entre outros, em diversas espécies animais, incluindo felinos, caninos, hienas, lagomorfos, primatas, cervídeos e bovídeos. Existem varias vertentes de estudos sobre o assunto, e para obtenção de dados mais fidedignos, novos substratos têm sido utilizados para mensuração dos glicocorticoides e demais hormônios, como amostras urinarias, fecais e até salivares. Como veremos a frente, o substrato utilizado irá variar de acordo com a espécie e seu metabolismo.

Outra peça de extrema importância nessas avaliações são os métodos de mensuração utilizados. Os mais comumente utilizados são os imunoensaios, dentre eles o radioimunoensaio (RIA) e o enzimaimunoensaio (EIA). Ambos diferem pelo tipo de anticorpo utilizado e pela forma como é feita a leitura dos complexos formados.

O escopo do presente trabalho consiste em confrontar os resultados dos metabolitos de glicocorticoides fecais de gatos domésticos obtidos através do RIA *versus* EIA. Nossa hipótese é que os resultados sejam divergentes quantitativamente, porém acreditamos que sejam semelhantes qualitativamente.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DEFINIÇÃO DO ESTRESSE

A palavra estresse foi primeiramente utilizada por Hans Selye, (1936 apud TEIXEIRA et al., 2008). O termo estresse foi baseado no termo físico stress, que significa pressão. Seyle (1936) denominou Síndrome do Estresse ao conjunto de respostas não específicas do organismo frente a agentes ameaçadores da sua integridade (TEIXEIRA et al., 2008). Nesta ocorreria à tríade patológica, representada pela hipertrofia da adrenal, ulceração gastro-intestinal e a involução do timo (TEIXEIRA et al., 2008).

Selye (1936) também propôs o termo "Síndrome Geral de Adaptação", o qual ocorreria em três estágios – reação de alarme, fase de resistência e fase de exaustão. O primeiro estágio corresponde à resposta inicial do organismo a qualquer ameaça, com ativação do SNC (sistema nervoso central) e do eixo HHA (hipófise-hipotálamo-adrenal). Neste estágio temos aumento da concertação basal de catecolaminas e glicocorticoides. Caso o estímulo seja mantido, temos inicio o segundo estágio, fase de resistência, caracterizada por mecanismos adaptativos, e caso esses recursos não sejam suficientes, instala-se a fase de exaustão, com depleção das reservas energéticas e desenvolvimento de enfermidades, podendo culminar em óbito (TEIXEIRA et al., 2008).

Chrousos e Gold (1992) redefiniram estresse como o estado de desarmonia ou ameaça a homeostasia, promovendo adaptação fisiológica e comportamental, podendo ser especifica para um determinado estressor ou generalizada e inespecífica (TEIXEIRA et al ,2008).

Goldstein (2003) propôs que as alterações no SNC não estão relacionadas apenas com situações emergenciais. Situações rotineiras podem causar oscilações neuroendócrinas para manter a homeostasia, como presença ou não de alimentos, mudanças na postura e até mesmo falar em publico, nos humanos (TEIXEIRA et al ,2008).

Os estímulos estressantes podem ser fatores físicos, fisiológicos, ambientais ou psicológicos. A duração do estímulo, mais que sua intensidade, é o que parece determinar seu impacto. Assim, estímulos prolongados geralmente são considerados negativos ("distress"), enquanto estímulos breves e que não se repetem, são considerados positivos ("arousal")

(HERNÁNDEZ-JÁUREGUI et al.,2005, PALME et al., 2005, KEAY et al., 2006, SCHERIFF et al., 2011; RAMOS, 2012).

2.2 FISIOLOGIA DO ESTRESSE

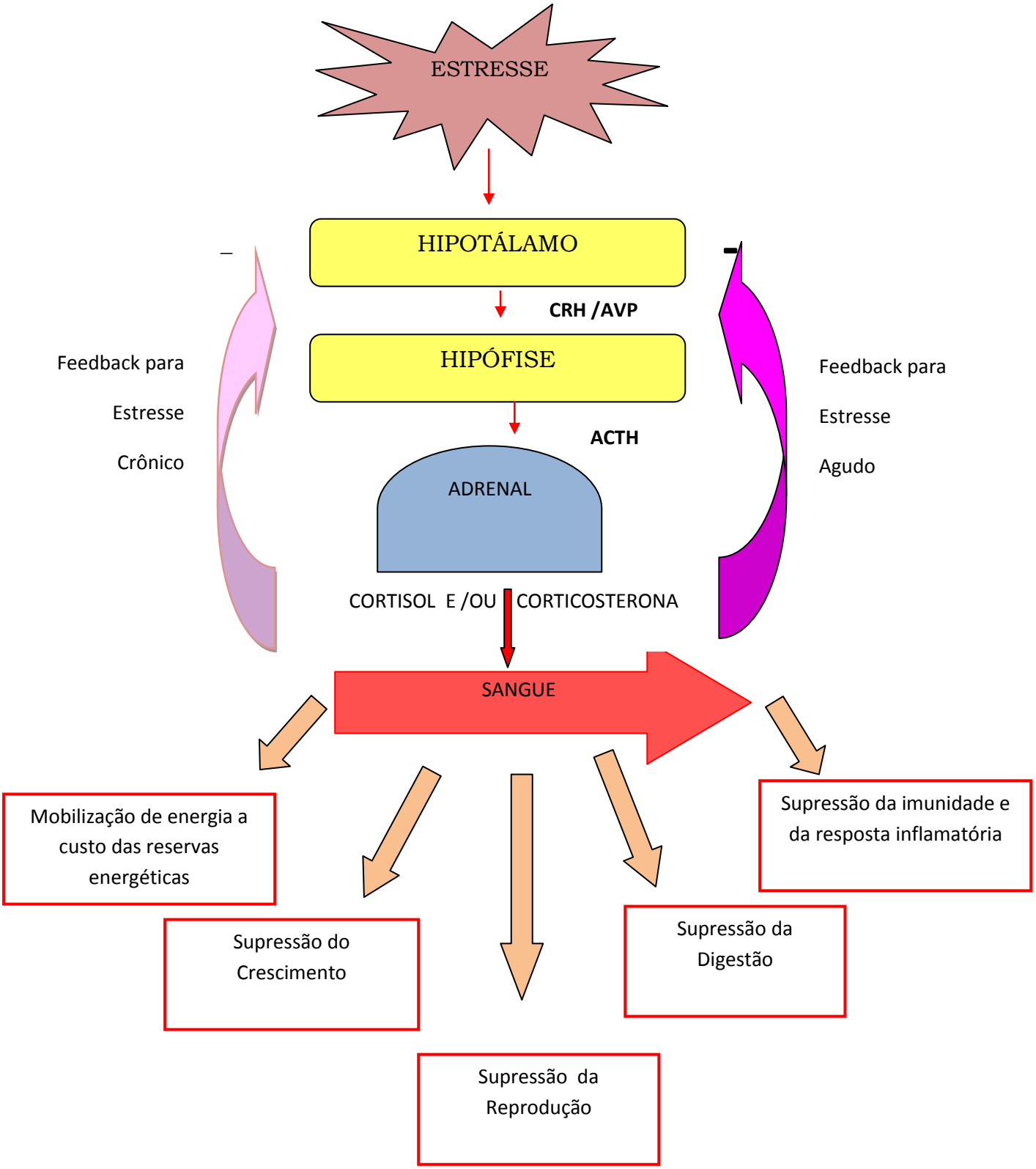
O controle fisiológico do estresse se dá por meio de uma cascata de eventos, extremamente complexa e meticulosamente controlada por uma série de hormônios e neurotransmissores.

Sabe-se hoje que existem dois principais eixos reguladores na via do estresse, assim como proposto por Selye, que são simpato-adrenal (SA) e hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA). Em ambos os eixos, a glândula adrenal tem participação fundamental, secretando catecolaminas e glicocorticoides. Muitos outros hormônios estão envolvidos, porém estes dois são os mais importantes (HOTZEL E MACHADO FILHO, 2000; PALME et al., 2005). O estresse mobiliza varias regiões cerebrais, especialmente o hipocampo. Esta região está envolvida no processo de memória, regulação do eixo HHA e com outras funções cognitivas (TEIXEIRA et al., 2008, SCHERIFF et al., 2011).

Os estímulos estressores convergem para uma via comum no cérebro, o núcleo paraventricular (NPV), localizado na área medial do hipotálamo. O NPV é o local tanto de ativação do eixo HHA, quanto de inativação, decorrente do feedback dos glicocorticoides (GUYTON E HALL, 1997; SCHERIFF et al., 2011).

Quando um animal se depara com um agente estressor o NPV é estimulado, levando a liberação do hormônio liberador de corticotrofinas (CRH) e de outros secretagogos, como a arginina vasopressina (AVP). A secreção destes neuropeptídeos, nos vasos porta-hipofisários, irá estimular a hipófise anterior, com a consequente liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Este, por sua vez, atua no córtex da glândula adrenal, estimulando a síntese e secreção de glicocorticoides, produto final do eixo HHA, como poderemos ver na figura 1 (GUYTON E HALL, 1997, PALME et al., 2005, TEIXEIRA et al., 2008, SCHERIFF et al., 2011). Em geral este evento pode levar de três a cinco minutos (SCHERIFF et al., 2011).

Figura 1- Esquema representativo do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e suas respostas frente ao estresse agudo e crônico



Fonte : Scheriff et al. (2011)

Como já foi dito, o estresse pode ser agudo ou crônico, sendo este último o mais prejudicial. O organismo responde de formas fisiologicas distinta a estes dois agentes, como podemos ver na figura acima. O estresse crônico pode aparecer na forma de aumento plasmático de glicocorticoides, como visto em humanos, ratos e ovelhas (BEERDA et al., 1999). Entretanto em algumas espécies o valor sérico de esteroides pode voltar ao normal após um período, e o que será observado são alterações no eixo HHA, tornando-se hiper-estimulado (esquilos, macacos) ou a córtex da adrenal torna-se hiper-sensível ao ACTH (galinhas, vacas e ovelhas) (CARLSTEAD et al., 1993, MORMÉDE et al., 2007). De toda forma só será possível visualizar tais alterações quando o eixo é reestimulado.

Os glicocorticoides são hormônios esteroides metabolizados a partir do colesterol (FUJIHARA, 2008). Eles permitem, estimulam ou suprimem respostas durante o estresse, e preparam o cérebro para um subsequente estressor. A elevação em suas concentrações estimula a degradação de proteínas e RNA nos músculos, pele, tecido adiposo, tecido linfoide e tecido conjuntivo, além de exercer um efeito significativo sobre o metabolismo dos carboidratos, pela inibição da captação da glicose e metabolismo dos tecidos periféricos, particularmente musculatura e adipócitos (DICKSON, 1996 ; MCKENZIE E DEANE , 2005).

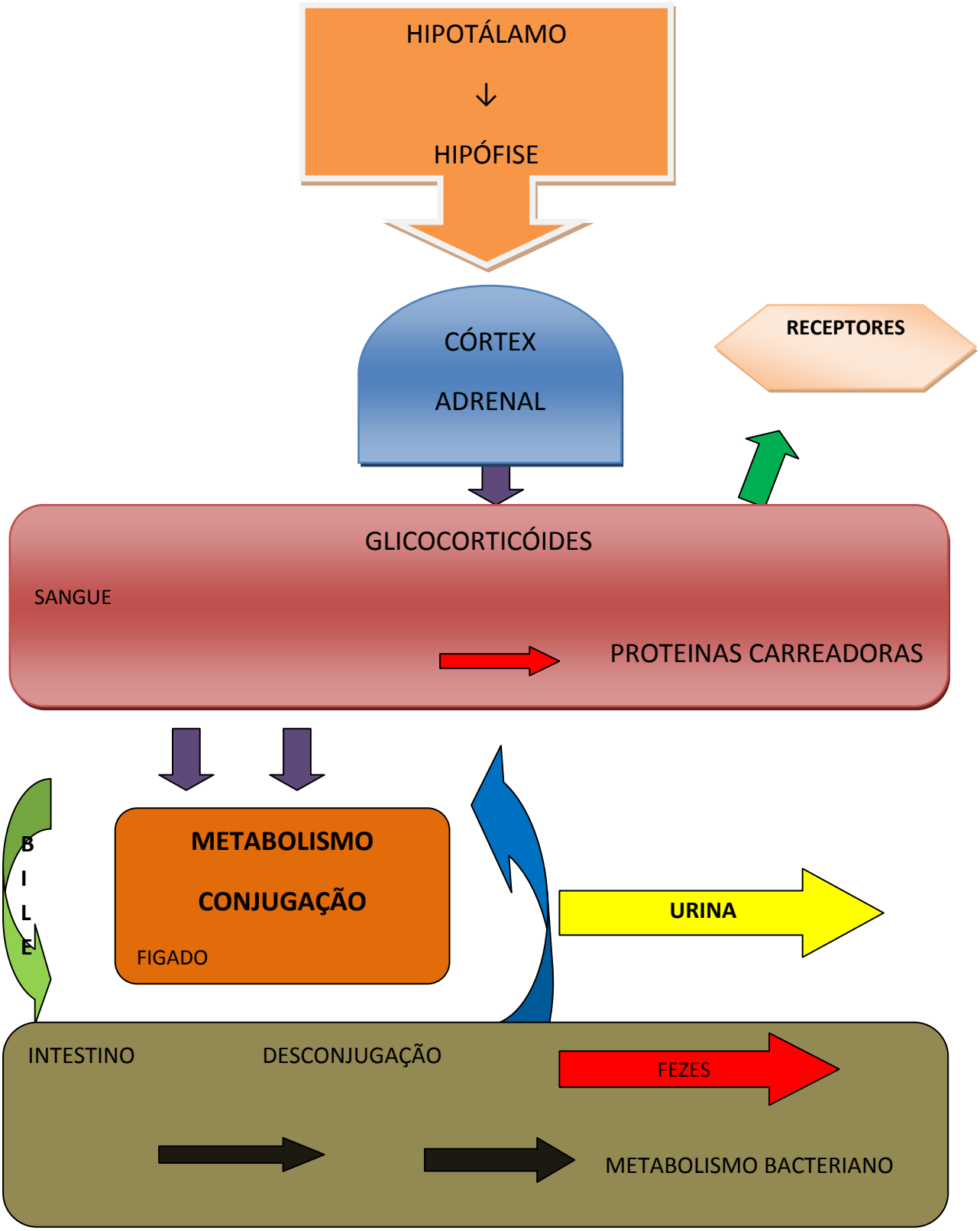
Os glicocorticoides mais importantes são o cortisol e a corticosterona. A predominância de cada um deles varia entre as espécies. Na maioria dos mamíferos, o principal glicocorticoide é o cortisol, exceto em algumas espécies de roedores, como o rato (*Rattus norvegicus*), que tem como principal glicocorticoide a corticosterona (HERNÁNDEZ-JÁUREGUI et al.,2005). Nos gatos domésticos temos uma proporção de 4:1 de cortisol e corticosterona (GRAHAN E BROWN,1996). Os mecanismos de ação de ambos também são diferentes, sendo a corticosterona de ação mais central e o cortisol de ação mais periférica (PALME et al., 2005).

O cortisol e outros esteróides são transportados no sangre de maneira livre (fração muito pequena) ou conjugados a globulinas específicas, como a transcortina (ou globulina ligadora de corticosteroide) (HERNÁNDEZ-JÁUREGUI et al.,2005). Os glicocorticoides são rapidamente lançados na circulação e sua vida media é de 80 a 120 minutos. Seu metabolismo ocorre principalmente no fígado, mas também pode ocorrer nos rins, tecido conjuntivo, fibroblastos e músculos. (HERNÁNDEZ-JÁUREGUI et al.,2005).

Após sua biotransformação, os esteróides são eliminados conjugados na urina ou bile. No intestino estes metabolitos podem ser reabsorvidos pela circulação entero-hepática ou

degradados pelas bactérias e eliminados nas fezes, como pode ser visto na figura 2. O metabolismo hepático do cortisol não está bem definido em todas as espécies, mas já foi descrito em ratos (*Rattus norvegicus*, *Mus musculus*), ovelhas (*Ovis Aires*) e no gato domestico (*Felis catus*) (HERNÁNDEZ-JÁUREGUI et al.,2005, PALME et al., 2005).

Figura 2 - Esquema representativo das vias metabólicas dos glicocorticoides



Fonte: Möstl e Palme, (2002) modificado

2.3 MENSURAÇÃO DOS GLICOCORTICOIDES

O entendimento da regulação hormonal e a busca por meios de detecção de suas concentrações levaram ao desenvolvimento de métodos de analise cada vez mais precisos. Antes da década de 60, substâncias contidas no sangue ou em outros fluidos, que apresentavam concentrações muito pequenas, eram quase impossíveis de serem dosadas. Eram utilizados ensaios químicos e bioensaios não específicos, como a solubilidade diferencial ou o conteúdo de iodo nos hormônios tireoidianos (GOMW,1979).

A técnica utilizando um anticorpo como ligante (imunoensaio) foi descrita pela primeira vez por Yallow e Berson (1960). Seu trabalho começou com estudos sobre o comportamento do I^{135}, marcando proteínas *in vivo*. O mesmo consistiu na injeção de insulina marcada e não marcada, verificando que o antígeno não marcado, por competição, inibia a ligação do antígeno marcado ao anticorpo. Desenvolveram então um ensaio para detectar e quantificar a insulina no soro de pacientes utilizando anticorpos anti-insulina, através do radioimunoensaio (BURDON et al., 1990). Vale ressaltar que tal estudo lhes garantiu o premio Nobel em Fisiologia e Medicina em 1977.

Neste mesmo ano, 1960, na Inglaterra, Ekins, desenvolveu um método similar para a determinação da tiroxina no plasma. Ekins porem usava uma proteína carreadora e não um anticorpo. (BURDON et al., 1990). Engvall e Perlamnn (1971) determinaram quantitativamente a imunoglobulina G através de um ensaio enzimático (BURDON et al., 1990)

A partir desses eventos, surgiram varias técnicas de mensuração de substancias que se apresentam em baixíssimas concentrações no sangue como hormônios, drogas e enzimas. Inicialmente o radioimunoensaio foi o mais difundido, sendo substituído por outros métodos biológicos, como os ensaios que utilizam compostos fluorogênicos, quimiluminogênicos e enzimas como marcadores.

O principio dos imunoensaios se baseia na ligação antígeno-anticorpo, porém com o uso de antígenos ou anticorpos marcados, podendo ser expresso pela equação abaixo:

$$\mathbf{Ag^{*}+Ag+Ac \longleftrightarrow Ag^{*}Ac + AgAc}$$

Ag- antígeno ou hormônio;

Ag* - antígeno ou hormônio marcado;

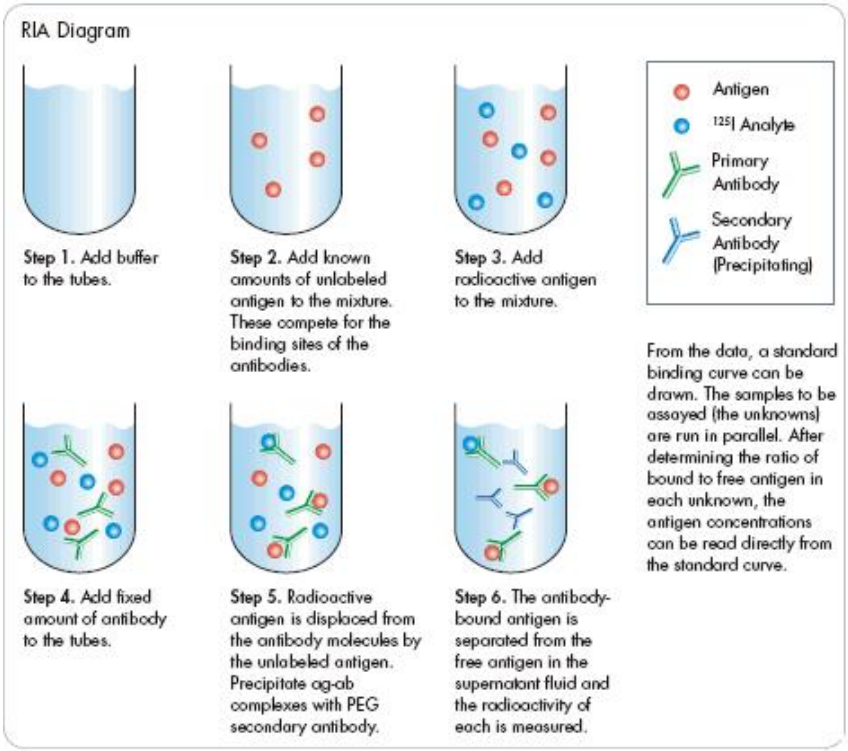
Ac- anticorpo

A concentração exata com que o equilíbrio é alcançado segue a lei de ação das massas, onde o estado de inalterabilidade é obtido quando o produto das concentrações dos dois lados da equação permanecem constantes, no que chamamos de zona de equivalência. Assim existe um equilíbrio entre a quantidade de ligações entre antígenos-anticorpos marcados e não marcados na amostra (PARSLOW et al., 2004).

No caso dos radioimunoensaios, os antígenos são marcados com um isótopo, tal como trítio (^{3}H), C^{14} ou I^{125}. (TIZART, 2002). Os imunoensaios utilizam outras formas de marcadores como reagentes, como por exemplo as enzimas marcadas (fosfatase alcalina), fluorescência ou quimioluminescencia (peroxidase da raiz forte), entretanto o mecanismo de ação dos mesmos é semelhante (TIZART,2002, PARSLOW et al., 2004).

A figura abaixo (figura 03) ilustra a técnica do radioimunoensaio.

Figura 3- Diagrama do radioimunoensaio



fonte –www.milipore.com (acesso 20 de janeiro de 2013)

Atualmente os dois métodos de mensuração de glicocorticoides mais utilizados são radioimunoensaio (RIA) e o enzimaimunoensaio (EIA) (HARPER E AUSTAD,2000 ; DEHNHARD et al.,2003).

Cada ensaio possui seus pontos positivos e negativos. As vantagens do EIA são a não utilização de materiais radioativos, os equipamentos são menos custosos e os reagentes de fácil preparação. Entretanto muitos anticorpos precisam ser importados e os tampões utilizados em outros países diferem dos nossos, o que pode ocasionar em resultados diferentes (BROWN et al., 2004 ; MÖST et al., 2005). Além disso os anticorpos são confeccionados apenas em dois laboratórios experimentais.

Embora as dosagens por meio de ensaios radiométricos necessitam de leitores beta ou gama e anticorpos radiomarcados, muitas dosagens através destes ensaios foram validados para várias espécies (BROWN et al., 2004 ; MÖST et al., 2005). Seus anticorpos são fácil aquisição, embora tenham um período de vida muito curto.

As concentrações séricas dos glicocorticoides são amplamente utilizadas como um indicativo da presença de um estressor, como já dito anteriormente. Entretanto há muitos contratempos relacionados à mensuração dos hormônios do estresse, principalmente de amostras sanguíneas. A secreção dos mesmos ocorre de forma pulsátil, assim as concentrações podem sofrem alterações em poucos minutos, dessa forma amostras coletadas por venopunção nos dão um resultado pontual (PALME et al., 2005). Além disso, devemos levar em consideração o estresse da coleta e a quantidade de sangue que pode ser coletada (PALME et al., 2005). Fora isso, temos casos em que é perigoso ou impossível realizar tais coletas, como em animais selvagens. Dessa forma inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas para que a mensuração seja feita de uma forma não invasiva, lançando mão de outros substratos, tais como fezes, urina, mistura de ambos no caso de aves, saliva, leite, pelo e cabelo, no caso da espécie humana (BEERDA et al., 1996,WASSER et al., 2002;).

Nas excreções de todos os vertebrados há uma grande quantidade de metabólitos de hormônios esteróides como andrógenos, estrógenos, progestágenos, mineralocorticóides e glicocorticoides (*dehidroepiandrosterona e corticosterona* – mais presente em aves, anfíbios, répteis e muitos roedores e *cortisol* nos demais mamíferos e peixes) (WASSER et al., 2002, MÖST et al., 2005). A escolha do melhor substrato a ser utilizado irá variar de acordo com a via de metabolização da espécie em estudo (PALME et al., 1996).

Alguns fatores relevantes devem ser considerados quando são realizadas mensurações com amostras não sanguíneas, como possíveis contaminações da amostra (FUJIHARA,2008). A longevidade dos hormônios presentes na amostra também é um fator muito importante e pode ser influenciada pelas condições de trabalho (temperatura/umidade) ou forma de conservação. Dessa forma a sílica e o etanol são utilizados para conservações a curto prazo e o congelamento, secagem ou congelamento à seco para conservações a longo prazo (WASSER et al., 2002).

Mudanças na dieta do animal também podem alterar a excreção biliar, podendo incorrer em erros na avaliação. Nos estudos com babuínos essa alteração foi eliminada através da liofilização das amostras antes da pesagem (WASSER et al., 1993). Hiebert et al (2000) relataram que a liofilização eliminou de forma eficiente a variação de quantidade de água presente nas amostras, uma fonte potencial de variação entre as concentrações hormonais.

Outro fator importante quando se lança mão de amostras não sanguíneas, refere-se à validação do ensaio que será utilizado. As validações devem ser feitas de forma analítica, ou seja, avaliando a sensibilidade do ensaio, sua precisão, paralelismo entre os resultados encontrado, além da especificidade. Afora isso, são realizadas validações fisiológicas, com a aplicação de ACTH e/ou dexametasona e a avaliação da capacidade do ensaio em mensurar grandes variações (PALME et al., 2005). As pequenas variações do eixo HHA são mensuradas através de validações biológicas. Esta se dá submetendo os animais a variações ambientais ou pequenos agentes estressantes, como vacinações (PALME et al., 2001; (TOUMA E PALME,2005).

A sensibilidade do ensaio consiste na menor quantidade confiável de hormônios detectada e é dividida em dois tipos: menor quantidade de hormônio mensurável diferente de zero e com nível de confiança de 95% na curva padrão e menor quantidade de hormônio que pode ser mensurada por unidade de fluido biológico (quantidade de hormônio/ml de plasma) (BROWN et al., 2004).

Na medicina veterinária um dos maiores desafios é o encontro do ensaio mais apropriado. Como já foi dito cada espécie animal tem um metabolismo de glicocorticoides distinto, assim um mesmo ensaio pode ser apropriado para uma determinada espécie e não para outra. As variações são tantas que podem aparecer até entre os sexos dentro de uma mesma espécie, provavelmente devido a atividade bacteriana intestinal, como foi visto em pôneis e porcos (SCHATZ E PALME,2001; PALME et al., 2005).

Com relação à espécie do presente estudo, os gatos domésticos tem sido utilizados como modelo de pesquisa para os felinos selvagens (GRAHAN E BROWN, 1996). Estudos realizados com infusão de hormônios radio-marcados permitiram constatar que por volta de 80% dos metabólitos esteróides são eliminados nas fezes (GRAHAN E BROWN, 1996, SCHATZ E PALME, 2001), como veremos em detalhes a frente. A partir daí imunoensaios foram validados para a quantificação dos mesmos nas fezes de felinos domésticos e selvagens (GRAHAN E BROWN, 1996, SCHATZ E PALME,2001; VIAU et al.,2005; PAZ et al.,2007).

Graham & Brown (1996) foram pioneiros no uso do radioimunoensaio em felinos domésticos. Em seu estudo foi administrado cortisol marcado com trítio em três fêmeas, com idade média entre 1 a 3 anos. Na sequencia, foram coletadas amostras de fezes e urina a cada

duas horas por cinco dias após administração. O intuito do estudo era determinar o tempo de eliminação dos metabolitos, sua principal via de excreção e validar um ensaio radiométrico que fosse capaz de mensurá-los. Para quantificar os metabolitos dos glicocorticoides tanto nas fezes quanto na urina foi utilizado a cromatografia liquida de alta performance (HPLC) de fase reversa.

Dentre os resultados foram observados que mais de 80% dos metabolitos do cortisol foram eliminados pelas fezes. Além disso, os autores observaram, no HPLC, a presença de vários grupos de metabolitos presentes, enquanto que os glicocorticóides em sua forma pura são praticamente inexistentes. Foram encontrados na urina quatro principais grupos de metabolitos, enquanto nas fezes foram encontrados muitos grupos de metabolitos.

Graham & Brown (1996) também utilizaram tais amostras para validar o ensaio radiometrico mais apropriado. A priori foi utilizado o ensaio radiométrico RIA cortisol, porém este não apresentou resultado satisfatório, não conseguindo realizar as mensurações necessárias. Em substituição se lançou mão do ensaio radiométrico RIA duplo corticosterona, e este apresentou boa funcionalidade. Estes resultados são atribuidos a reações cruzadas entre os metabólitos e os anticorpos policlonais utilizados.

Em pesquisa subseqüente, Schatz & Palme (2001) reavaliaram a eliminação dos metabolitos de glicocorticoides nas fezes e urina e validaram um ensaio enzimático (EIA) para os mesmos, estimulando e posteriormente suprimindo o eixo hipófise- hipotálamo-adrenal (HHA). Para avaliação da excreção dos metabolitos foram utilizados quatro animais, agora dois machos e duas fêmeas, entre 09 a 12 anos, e todos foram inoculados com cortisol marcado radioativamente, porem agora com C^{14}. Novamente o HPLC foi utilizado nas amostras para identificar a presença de glicocorticoides e de seus metabolitos.

Dentre os resultados observados, no HLPC puderam ser vistos a presença de grande quantidade de metabolitos, conjugados ou não, porem os não-conjugados em maior quantidade. Foram utilizados então três ensaios enzimáticos para mensuração dos mesmos, na tentativa de se validar qual é o mais adequado. Os ensaios enzimáticos utilizados foram – cortisol, corticosterona e 11- oxoaetiocholanolone (11-oxo). Este mensura um grupo especifico de metabolitos de glicocorticoides – 11,17 dioxoandrostanes (11,17 DOA). Este grupo aparece em grande quantidade nas fezes dos felinos domésticos, devido a presença, no trato gastro-intestinal, de bactérias produtoras de C17-C20 desmolase, enzima responsável pela clivagem do cortisol em 11,17 DOA.

Nenhum dos ensaios conseguiu acompanhar exatamente o pico de radioatividade, entretanto, para gatos domésticos o que melhor conseguiu mensurar os metabolitos foi o EIA **11-oxo**, diferente do resultado observado nos cães que foi o EIA cortisol. Entretanto, para se validar um ensaio, não basta que ele consiga mensurar a substancia esperada, mas que também consiga acompanhar as mudanças fisiológicas, e para tanto os animais tiveram seu eixo HHA estimulado com a aplicação de ACTH e após alguns dias, foram submetidos a dexametasona, suprimindo o eixo. Novamente foram utilizados os três ensaios, e pode-se observar, como no primeiro desafio, que o ensaio EIA 11- oxo foi o mais apropriado. A validação biológica do ensaio enzimático 11-oxo foi realizada através da mensuração de metabolitos de cortisol fecal um dia antes e dois dias após vacinação anual de dez gatos (PALME et al., 2001).

Schatz & Palme (2001) concluiram também que o EIA corticosterona não foi considerado adequado. Este não conseguiu quantificar os metabolitos de cortisol e também não foi eficiente para acompanhar as alterações do eixo HHA. Isso se deve a presença de inúmeras reações cruzadas com outros metabolitos de esteroides, principalmente os andrógenos - (7,8% 5β-androstane-3,17dione e 4,8% 5 β-androstane-3α-ol-17-one).

Young et al (2004) foram precursores na realização de estudos comparativos entre os ensaios. Para tal foram mensurados metabolitos de glicocorticoides das fezes de várias espécies de carnívoros domésticos ou não. Os ensaios utilizados foram o RIA duplo corticosterona (assim como GRAHAN E BROWN, 1996) e o EIA cortisol. Foram utilizados apenas dois gatos domésticos (um casal), entretanto os resultados obtidos foram interessantes. Estes viram melhores resultados com o ensaio radiométrico duplo corticosterona na fêmea e com o ensaio enzimático cortisol no macho. Para qualificar os resultados encontrados, Young et al (2004) utilizaram o HPLC e observaram que as frações mensuradas por cada ensaio foram divergentes, sugerindo assim que os ensaios podem estar mensurando diferentes grupos de metabólitos.

2.4 PRESENTE PESQUISA

Como vimos anteriormente, não há um consenso na literatura sobre qual o melhor ensaio para mensurar os glicocorticoides fecais em gatos. Fora isso, há poucos estudos envolvendo bem-estar em gatos domésticos que vivem domiciliados, sozinhos ou em grupos. Pensando nisso formou-se, no departamento de Clinica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, um grupo de estudos sobre tal assunto. Baseados em pesquisas publicadas com outras espécies, foi realizado um estudo anterior a este.

Neste primeiro estudo, Ramos e colaboradores (2012), avaliaram os metabólitos dos glicocorticoides fecais, através do radioimunoensaio (RIA kit duplo corticosterona - assim como foi proposto por Graham & Brown (1996)), em gatos que viviam sozinhos (i.e. único *pet* da família) comparados com gatos que viviam em grandes colônias (i.e. mais de 10 gatos por casa), não sendo encontradas diferenças significativas nos valores de glicocorticoides fecais entre os grupos. Os autores acreditam que esse resultado deve-se a um mecanismo social compensatório, tal como propôs Leyhaussen, 1953(*apud* LICHTSTEINER E TURNER,2008).

Subsequentemente, e tendo como base a pesquisa realizada por Lichtsteiner & Turner (2008), resolveu-se confrontar gatos que viviam sozinhos com gatos que vivem em pequenas colônias (i.e. 2-4 gatos por casa). No estudo de Lichtsteiner & Turner (2008) não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (i.e. gatos sozinhos *versus* gatos em pequenas colônias), entretanto, para a mensuração dos valores de glicocorticoides foram utilizadas amostras urinárias, e é sabido que a maior parte dos metabólitos dos glicocorticoides nos gatos domésticos é excretada pelas fezes (GRAHAN E BROWN, 1996 ; SCHATZ E PALME, 2001).

Assim sendo, neste segundo estudo avaliamos os dois grupos de animais (i.e. gatos sozinhos *versus* pequenas colônias), tal como fez Lichtsteiner & Turner (2008), porém mensurando os metabólitos do cortisol em amostras fecais.

Outra lacuna encontrada na literatura, refere-se aos ensaios imunológicos utilizados. Os ensaios radiométricos são amplamente utilizados, seu protocolo de execução está bem estabelecido e seus reagentes/anticorpos são de fácil aquisição. Entretanto, trata-se de um ensaio radioativo. Assim além de produzir resíduos que devem ser destinados corretamente, seus isótopos possuem uma meia vida muito curta e sua leitura requer equipamentos custosos.

Quanto aos ensaios enzimáticos, estes são mais simples de serem executados, requerem equipamentos menos onerosos, porém seus anticorpos são de difícil aquisição.

Considerando-se as limitações e lacunas dos referidos estudos, o presente estudo objetivou mensurar os metabólitos de glicocorticoides fecais de gatos sozinhos *versus* pequenas colônias através dos dois ensaios validados para a espécie (RIA duplo corticosterona e EIA 11- oxoaetiocholanolone). Nossa hipótese, como já dito anteriormente, é que encontraremos diferenças quantitativas entre os ensaios, porem não qualitativas.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL

O presente estudo foi desenvolvido em quatro localidades distintas. A conservação das amostras e sua pesagem foram realizadas na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – Departamento de Clínica Médica. As extrações dos metabólitos de glicocorticoides das fezes foram efetuadas no Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo. O radioimunoensaio aconteceu no laboratório de Dosagens Hormonais - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – Departamento de Reprodução Animal. O enzimaimunoensaio foi executado na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Viena – Departamento de Bioquimica.

3.2 ANIMAIS

Parte da pesquisa foi realizada no departamento de clinica médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Entretanto, se tratando de pacientes saudáveis que foram recrutados para tal estudo, não seria plausível esperar que o recrutamento de até 140 gatos, ocorresse naturalmente e exclusivamente via hospital veterinário.

Diante disto, decidiu-se que os proprietários seriam recrutados através do hospital veterinário e também de outras clínicas e hospitais veterinários particulares localizados na cidade de São Paulo. Nestes locais, após contato inicial e apresentação da pesquisa, seguido da devida autorização do médico veterinário responsável, cartazes de chamamento foram colocados (apêndice 01), convidando proprietários que tinham um, dois, três ou quatro gatos, exclusivamente, a participarem da pesquisa. Os mesmos podiam ser orientados pela recepção do hospital ou clinica, ou fazer contato diretamente com os pesquisadores através do telefone ou endereço eletrônico que estavam afixados no cartaz.

Os proprietários recrutados, em torno de 60 (sendo um terço deles proprietários de um gato, um terço com dois gatos e o outro terço de três ou quatro gatos), foram contactados por

telefone ou por mensagem eletrônica (apêndice 02). No contato inicial realizado com cada proprietário, foi realizada uma breve entrevista, selecionando os animais e/ou os proprietários que estavam aptos e dispostos a participar da pesquisa. Além da resenha de cada animal (idade, sexo, raça e status sexual), foram feitas algumas outras perguntas, seguindo os seguintes critérios estabelecidos (questionário em apêndice 03- “check in”):

Critérios de Inclusão

- animais com mais de seis meses de idade;
- residir com o proprietário há, pelo menos, quatro meses;
- não apresentar nenhum problema médico concomitante;
- não estar tomando nenhum tipo de medicação ou suplemento alimentar;
- não apresentar problemas comportamentais;
- viver exclusivamente domiciliado;
- não haver nenhum outro “pet” na casa, exceto gatos;

Critérios de Exclusão

- livre acesso a rua (exceto áreas dentro do próprio quintal);
- uso de medicamentos ou suplementos;
- alterações comportamentais;
- problemas médicos concomitantes;
- viagens, mudanças de casa, introdução ou saída de um membro da casa (durante o período de coletas);
- visitas ao veterinário ou banhos (durante o período de coleta);
- fêmeas no estro;
- presença de outros "pets”;

Os animais selecionados para o estudo foram então divididos em três grupos. Os grupos foram organizados de acordo com o numero de gatos por residência, assim – grupo I – um gato, grupo II- dois gatos e grupo III três ou quatro gatos, num total de 120 animais participantes e de 478 amostras fecais (em dois casos o proprietário conseguiu coletar apenas três amostras)

Solicitamos a cada proprietário que escolhesse aleatoriamente um dia da semana e realizasse assim as coletas sempre naquele mesmo dia, num total de quatro semanas. No momento da retirada das amostras, foi realizado um check out, esquadrinhando possíveis problemas que poderiam ter ocorrido no período das coletas (questionário em apêndice 04).

Critérios de Exclusão pós-recrutamento

- qualquer problema médico;
- eventos estressantes;
- fêmeas no cio durante o período de coleta;

A distribuição dos animais segundo o sexo, idade, raça e status sexual podem ser visualizadas na tabela abaixo (tabela 1):

Tabela 1 - Distribuição dos animais dentro dos grupos segundo sexo, idade, definição racial e status sexual

Variável	Categoria	Grupo I		Grupo II		Grupo III		Total	P
		N	%	N	%	N	%	N	
Sexo	Fêmeas	12	52.2	22	55.0	34	59.7	68	0.802
	Machos	11	47.8	18	45.0	23	40.3	52	
	Total	23	100.0	40	100.0	57	100.0	120	
Idade	< 2 anos	8	34.8	11	27.5	15	26.3	34	0.741
	>= 2 anos	15	65.2	29	72.5	42	73.7	86	
	Total	23	100.0	40	100.0	57	100.0	120	
Definição Racial	CRD[1]	5	21.7	9	22.5	9	15.8	23	0.669
	SRD[2]	18	78.3	31	77.5	48	84.2	97	
	Total	23	100.0	40	100.0	57	100.0	120	
Status Sexual	Inteiros	1	4.3	5	12.5	7	12.3	13	0.538
	Castrados	22	95.7	35	87.5	50	87.7	107	
	Total	23	100.0	40	100.0	57	100.0	120	

Observações: [1]- com raça definida; [2]- sem raça definida;

3.3 COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

Como já foi dito, os proprietários foram instruídos a escolherem aleatoriamente um dia da semana e realizarem todas as coletas sempre no mesmo dia, num total de quatro amostras. As coletas deveriam ser feitas imediatamente após a defecação, evitando assim qualquer degradação bacteriana. Alias esta foi uma forma de nos assegurarmos que as amostras correspondiam a cada gato individualmente, em casas com mais de um animal.

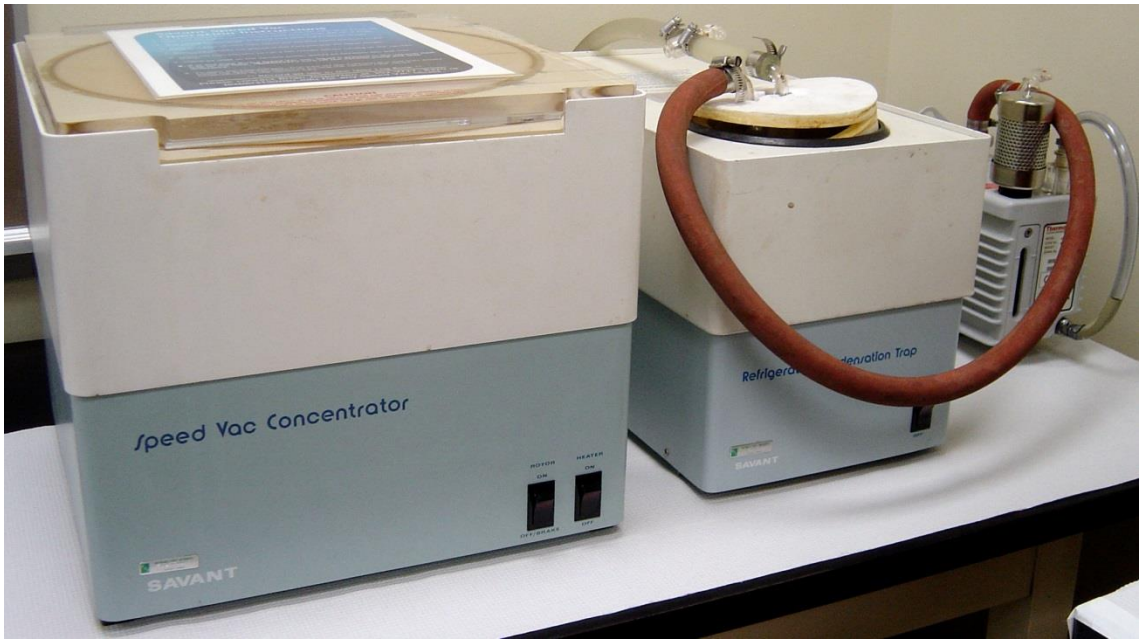
As amostras coletadas eram armazenadas em coletores universais, identificadas com nome, data e horário, e imediatamente submetidas ao congelamento, sendo mantidas no freezer até a data em que o pesquisador ia pessoalmente retira-las na residência do proprietário participante. Estas eram transportadas em sacolas térmicas com gelo reutilizável e conduzidas ao Departamento de Clinica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, onde eram armazenadas em freezer a -20º.C .

3.4 FRACIONAMENTO E LIOFILIZAÇÃO

Anteriormente a liofilização, as amostras foram fracionadas. Ainda congeladas, as mesmas foram homogeneizadas com um bastão de madeira e em seguida transferidas para tubos tipo falcon, de polipropileno, com tampa. A manutenção das mesmas foi feita em freezer a -20º.C até a liofilização. Esta era realizada semanalmente, e as amostras não ficavam mais de duas semanas congeladas sem serem liofilizadas.

Todas as amostras foram liofilizadas com auxilio de um aparelho evaporador giratório tipo Speed Vac (Speed Vac – Sc 110, Savant ^{R}), como pode ver na figura abaixo (figura 04). A liofilização das amostras padroniza o peso do material fecal utilizado e garante a ausência de ação bacterina, já que estas necessitam de água para o seu desenvolvimento, evitando assim possíveis degradações.

Figura 4 - Evaporador giratório tipo Speed Vac



Fonte- www.core.phmtox.edu (acesso 22 de maio de 2013)

3.5 EXTRAÇÃO DOS METABOLITOS DE GLICOCORTICÓIDES FECAIS

A extração realizada nesse estudo, assim como todas as realizadas pelo grupo de pesquisa do Departamento, segue a metodologia descrita por Schatz & Palme (2001) modificado.

Inicialmente alíquotas de 0,2 gramas de fezes liofilizadas foram colocadas em tubos de vidro de 15 ml e diluídas em 5 ml de metanol a 90% (900 ml de metanol:100 ml de água destilada). Estas foram levadas a um agitador tipo vortex, em velocidade máxima, por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3000rpm por 15 minutos. O sobrenadante recuperado foi transferido para eppendorfes de 1,5 m, identificados e conservados a -20º.C até a realização dos ensaios hormonais.

3.6 DOSAGEM HORMONAL DOS METABÓLITOS DE GLICOCORTICÓIDES

Os níveis de metabólitos de cortisol fecal foram mensurados através de dois imunoensaios – radioimunoensaio duplo corticosterona – e – enzimaimunoensaio 11-oxoaetiocholanolone. Não foram realizados procedimentos de validação, visto que ambos os ensaios já haviam sido validados para a espécie.

3.6.1 RADIOIMUNOENSAIO

O radioimunoensaio foi validado para gatos domésticos por Graham & Brown (1996). Para sua realização as alíquotas do sobrenadante, que estavam armazenadas a -20° C, foram diluídas em solução tampão para esteroides – do kit comercial (MP Biomedicals) na proporção de 1:20 (950 µl tampão e 50 µl amostra) e foram novamente mantidas a -20° C até os próximos passos.

O kit comercial utilizado foi (Double Antibody Corticosterone ImmuChemTM, MP Biomedicals, LLC), exatamente o mesmo que foi utilizado para a validação na espécie. Este utiliza o I^{125} marcado para quantificação dos esteroides na amostra. Sua quantidade mínima de detecção é de 7.7 ηg/ml. Na tabela abaixo (tabela 02) podemos observar as reações cruzadas do ensaio:

Tabela 2 – Percentual de reação cruzada do conjunto diagnóstico comercial para radioimunoensaio- Double Antibody Corticosterone ImmuChemTM, MP Biomedicals, LLC

ESTERÓIDE	REAÇÃO CRUZADA %
CORTICOSTERONA	100
DESOXYCORTICOSTERONA	0,34
TESTOSTERONA	0,10
CORTISOL	0,05
ALDOSTERONA	0,03
PROGESTERONA	0,02
ANDROSTENEDIONE	0,01
5 α-DIHYDROTESTOTERONA	0,01
COLESTEROL	< 0,01
DEHYDROEPIANDROSTERONE	< 0,01
SULFATO DE DEHYDROEPIANDROSTERONE	< 0,01
11- DESOXYCORTISOL	< 0,01
DEXAMETASONA	< 0,01
20 α-DIHYDROPROGESTERONA	< 0,01
ESTRONA	< 0,01
ESTRADIOL- 17α	< 0,01
ESTRADIOL - 17β	< 0,01
ESTRIOL	< 0,01
PREGNENOLONE	< 0,01
17 α- HYDROXYPREGNENOLONE	< 0,01
17 α-HIDROXYPROGESTERONA	< 0,01

Fonte: bula do kit de RIA

O ensaio foi realizado de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

3.6.2 ENZIMAIMUNOENSAIO

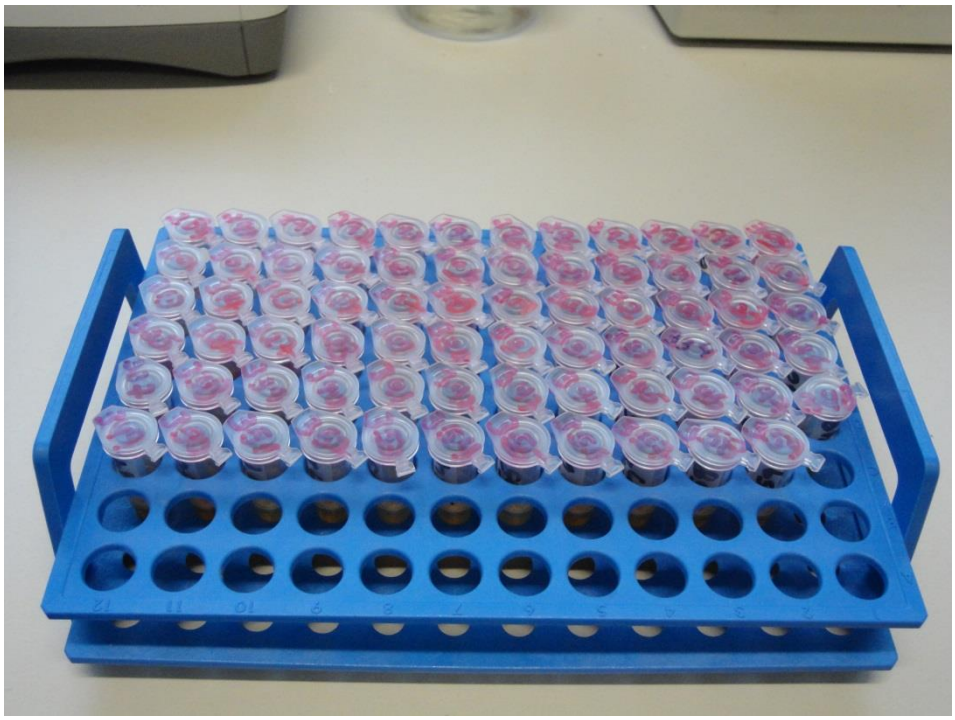
O ensaio enzimático utilizado - 11-oxoaetiocholanolone - foi o validado para a espécie, por Schatz & Palme (2001). O mesmo irá mensurar um grupo de metabólitos - 11,17-dioxoandrostanes – que parece estar presente em grande quantidade nas fezes dos gatos domésticos.

Como já foi dito, esta etapa do experimento foi realizada na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Viena – Departamento de Bioquímica, sob supervisão do prof. Rupert Palme. Para o transporte seguro das amostras, alíquotas de 0,5 ml foram secas em banho-maria, a temperatura de 70º.C. Já no departamento de bioquímica da Universidade de Viena, as amostras foram ressuspendidas em metanol a 90%, como podemos visualizar na figura 05.

Os procedimentos referentes ao ensaio foram realizados de acordo com os métodos utilizados pela instituição (parte do parque de equipamentos utilizados pode ser visto na figura 06) (Palme et al., 2001, Schatz e Palme, 2001).

Segue todo o protocolo em anexo (anexo A).

Figura 05- Preparação das amostras após ressuspensão



Fonte: Fragoso,P.L.(2013)

Figura 06- Parte do parque de equipamentos utilizados no processo de EIA – Universidade de Viena

Fonte: Fragoso, P.L. (2013)

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a mensuração do valor de metabólitos de glicocorticoides (GCM) de cada animal, foi calculada a mediana do valor das quatro amostras fecais. Em seguida elas foram utilizadas para comparar os valores gerais de glicocorticoides em função de cada variável de interesse. Essa medida foi estabelecida devido a desigualdade de valores encontrados dentro das quarto amostras e na tentativa de excluirmos valores discrepantes (“outliers”).

Dado que a variável GCM apresentou uma distribuição assimétrica, esta foi transformada em fração logarítmica, a fim de comparar os grupos e os fatores relacionados com a tendência central do GCM. Utilizou-se um modelo de efeito randômico para o estudo. Este leva em consideração a dependência da variável dentro do grupo no qual o gato se insere (VERBEKE E MOLENBERGHS, 2009).

As variáveis (sexo, raça, status sexual e idade) foram avaliadas de duas formas distintas: sua interação com o grupo e seu efeito principal considerando todos os gatos juntos (i.e. excluído a divisão por grupos). O teste utilizado para avaliar a tendência central das variáveis, desvinculando as mesmas dos grupos, foi o teste de correlação Pearson.

A interação dentro dos grupos foi dada pelo F interação do teste estatístico de Walt. Quando o valor de interação foi inferior a 0,15, foram realizadas novas analises para explorar as possíveis diferenças.

O intervalo de confiança utilizado foi de 95%. O mesmo foi obtido para o log (cortisol-RIA e cortisol-EIA). A transformação inversa nos limites desses intervalos nos dá a estimativa da tendência central.

Todas as análises foram realizadas utilizando o software R! ®.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

Os animais participantes da presente pesquisa foram divididos em três grupos distintos, de acordo com a quantidade de animais por residência. Foram recrutados e finalizaram a pesquisa 23 animais do grupo I(i.e. um gato por residência), 40 animais do grupo dois (i.e. dois gatos por residência -20 duplas) e 57 animais do grupo três (i.e. três ou quatro gatos por residência-17 trios/quartetos).

No grupo três havia sido recrutado mais um quarteto, entretanto nos primeiros imunoensaios realizados, observou-se que os mesmos apresentaram valores muito dispares dos demais encontrados (valores extremamente altos). Resolveu-se então que os mesmos seriam excluídos das demais etapas da pesquisa.

As amostras fecais dos animais recrutados foram analisadas através de dois imunoensaios, que são o radioimunoensaio (RIA) e o enzimaimunoensaio (EIA). O RIA utilizado foi o duplo corticosterona, o qual foi validado por Graham & Brown (1996). O EIA utilizado foi o 11- oxoaetilcholanolone (11-oxo). O mesmo também foi validado para gatos domésticos (PALME et al., 2001; SCHATZ E PALME, 2001; MÖST E PALME, 2002).Os resultados encontrados serão dispostos respeitando-se a distribuição dentro dos grupos.

4.1 RADIOIMUNOENSAIO

Os resultados obtidos através do ensaio radiométrico duplo corticosterona serão apresentados abaixo. Os mesmos serão exibidos respeitando-se sua distribuição nos grupos.

4.1.1 GRUPO I

O grupo I foi composto por 23 animais participantes, num total de 92 amostras. O valor médio encontrado para o grupo foi de **GCM = 100,93 ug/g de fezes secas.** O menor valor encontrado dentro do grupo I foi do animal Tadeu, com 17 ug/g de fezes secas. O maior valor encontrado foi do animal Frajola, com 240,50 ug/g de fezes secas.

A distribuição dos valores pode ser acompanhada através do gráfico abaixo (gráfico 01).

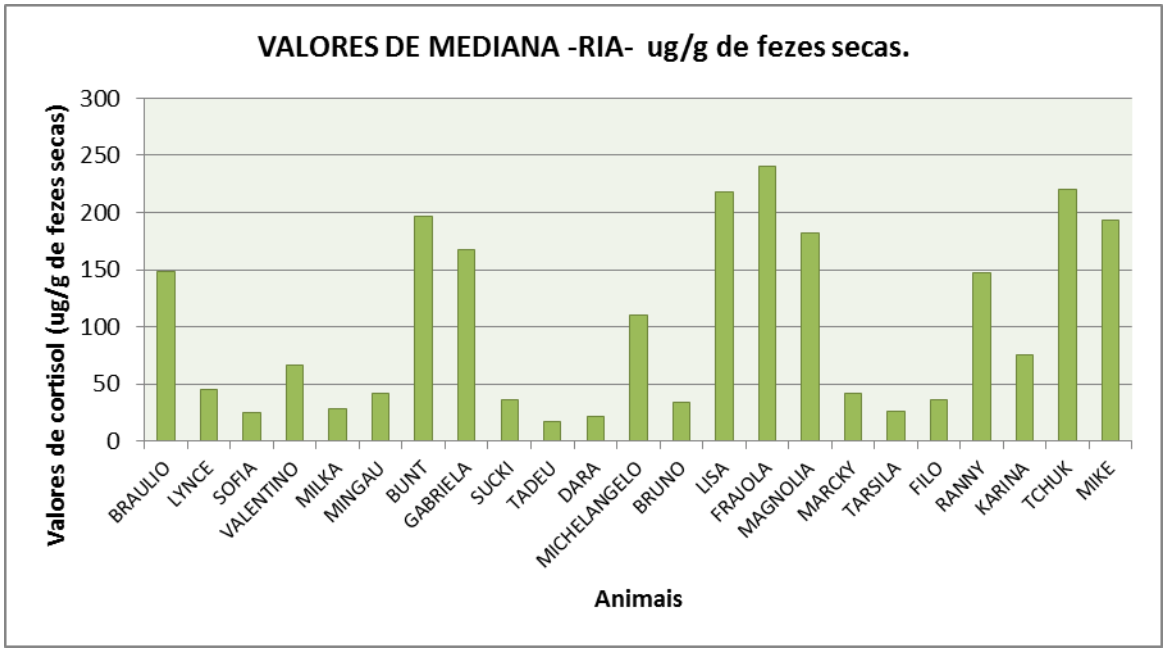


Gráfico 01 – Valores de mediana para a dosagem por RIA de metabólitos de cortisol (ug/g fezes secas) em amostras fecais de gatos que vivem sozinhos

4.1.2 GRUPO II

O grupo II foi constituído por 40 animais, num total de 160 amostras analisadas. O valor médio encontrado dentro do grupo foi de **GCM= 32,85 ug/g de fezes secas**. O menor valor encontrado foi de 10 ug/g de fezes secas, do animal Nino*. Já o maior valor observado foi de 76,50 ug/g de fezes secas do animal Charlote.

Os valores das medianas de cada animal podem ser vistos no gráfico abaixo (gráfico 02).

.

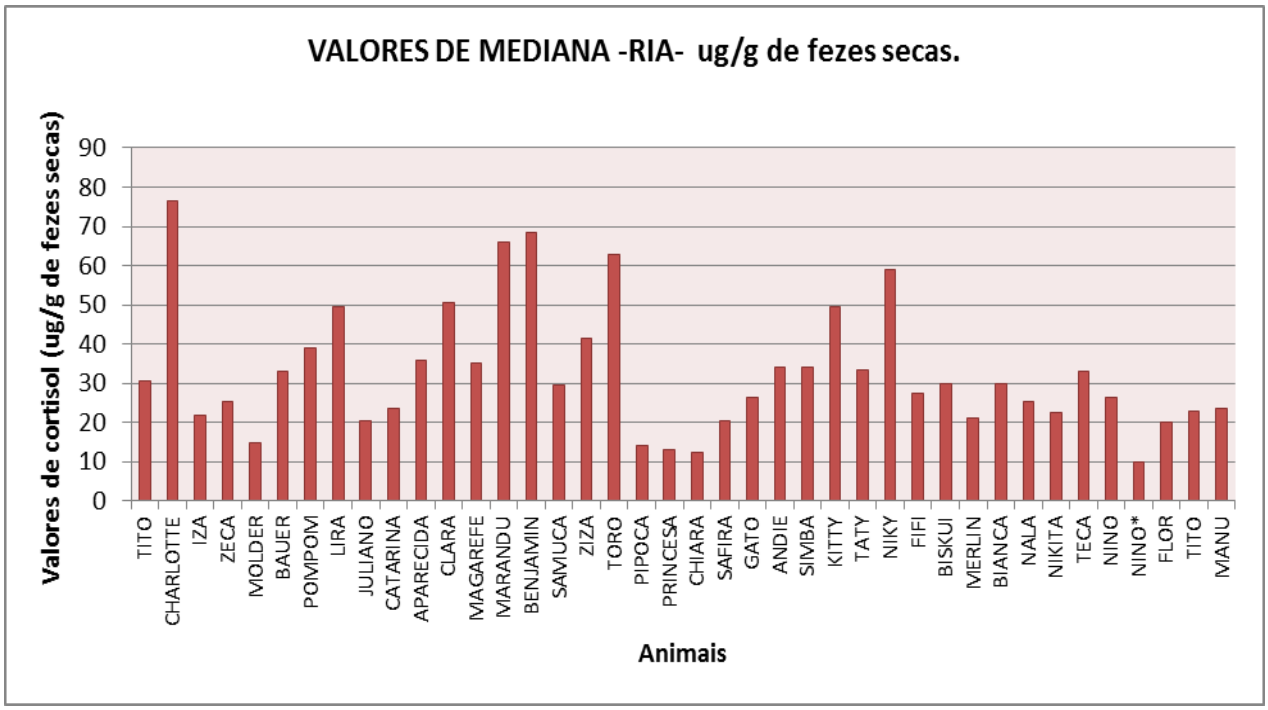


Gráfico 02 – Valores de mediana para a dosagem por RIA de metabólitos de cortisol (ug/g fezes secas) em amostras fecais de gatos que vivem em duplas

4.1.3 GRUPO III

O grupo III constitui-se de 57 animais, subdivididos em 17 trios ou quartetos. O total de amostras analisadas foi de 226, visto que dois animais (Princesa e Nala) possuem apenas três amostras fecais, já que os proprietários não conseguiram finalizar as coletas. O valor médio de metabolitos de glicocorticoides encontrados dentro do grupo foi de GCM= 33,18 ug/g de fezes secas. O menor valor encontrado foi de 9 ug/g de fezes secas, do animal Olavo. Já a maior concentração vista foi do animal Misti, com 122,50 ug/g de fezes secas.

No gráfico abaixo (gráfico 03) podem ser visualizados os valores encontrados por animal e sua distribuição dentro do grupo.

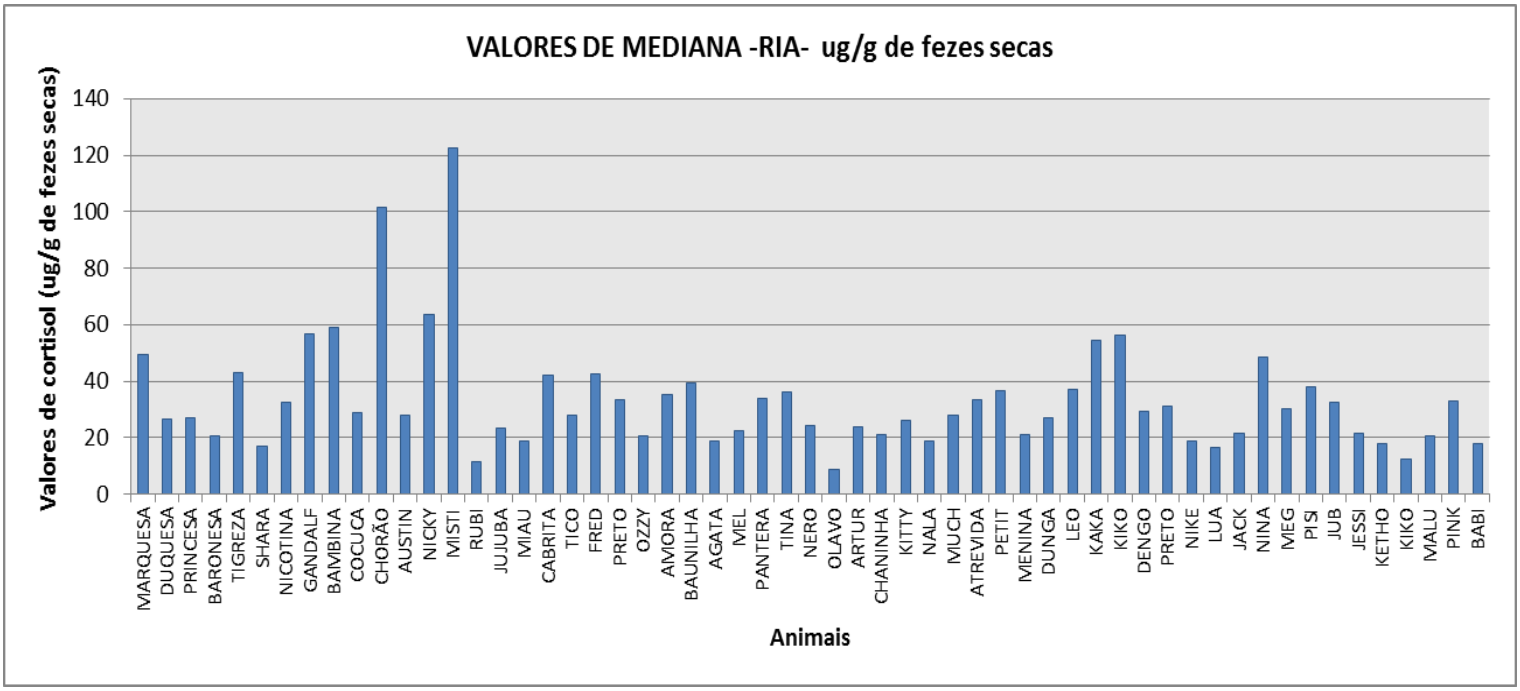


Gráfico 03 – Valores de mediana para a dosagem por RIA de metabólitos de cortisol (ug/g fezes secas) em amostras fecais de gatos que vivem em trios e/ou quartetos

Com base nos valores encontrados individualmente e dentre os grupos, conforme visualizados acima, temos as seguintes análises estatísticas.

Tabela 3 - Medidas descritivas do Cortisol - RIA segundo o grupo e o teste, obtido no modelo de efeitos aleatórios para o logaritmo de RIA

Variável	Categoria	N	Min	Q1	Mediana	Q3	Máx	Média	DP	P
Grupo	Sozinhos	23	17.00	34.00	67.00	182.50	240.50	100.93	16.36	<0.001
	Pares	40	10.00	22.25	29.75	37.50	76.50	32.85	2.56	
	3 or 4	57	9.00	21.00	28.00	37.00	122.50	33.18	2.61	

Referente aos valores médios de GCM encontrados dentro dos grupos, há uma diferença significativa entre eles ($p < 0,001$), todavia esta não se dá entre todos os grupos, e sim entre o grupo I (média :100,93; DP:16,36) e os demais grupos II e III (média – 32,85; DP-2,56 e média – 33,18; DP- 2,61, respectivamente) (gráfico 4).

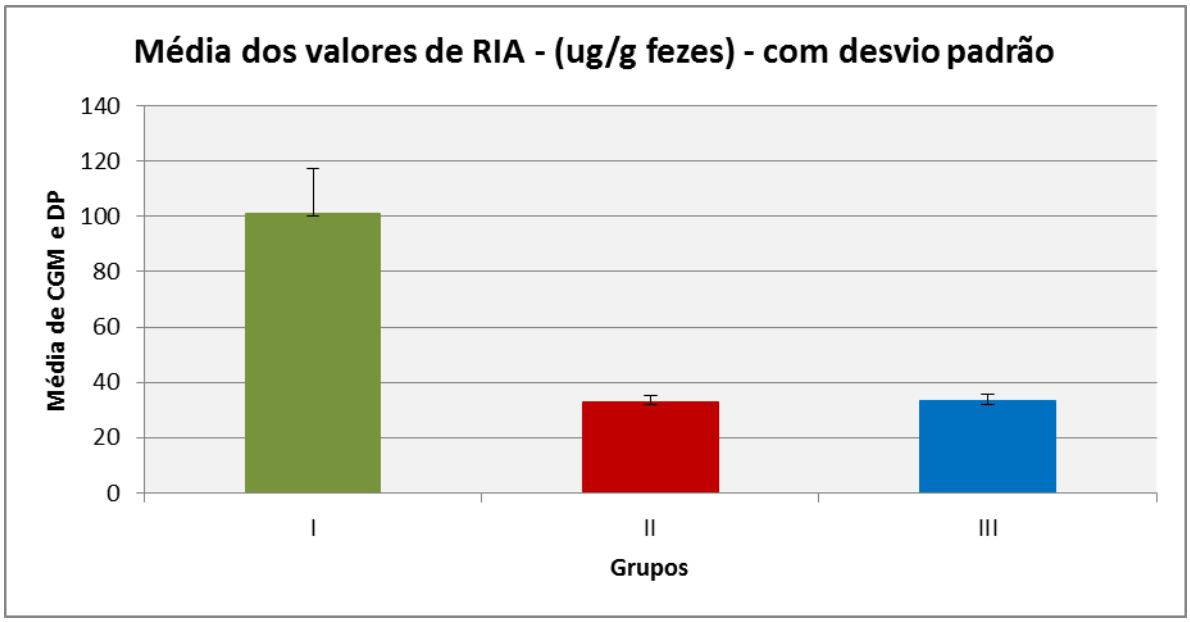


Gráfico 04 - Valores médios de GCM – com desvio padrão- dentro dos grupos- radioimunoensaio

Dentro das variáveis estudadas, temos os seguintes resultados:

Tabela 04 - Medidas descritivas do Cortisol - RIA de acordo com características demográficas e do teste obtido no modelo de efeitos aleatórios para o logaritmo de RIA

Variável	Categoria	N	Min	Q1	Mediana	Q3	Max	Média	DP	P
Sexo	Fêmea	68	11.50	22.00	30.25	41.75	217.50	43.68	5.25	Int: 0.832
	Macho	52	9.00	23.50	32.00	56.75	240.50	49.17	6.90	Sexo: 0.785
Definição Racial	CRD[1]	23	10.00	21.00	33.00	76.00	220.50	59.61	11.64	Int: 0.288
	SRD [2]	97	9.00	22.50	30.50	42.00	240.50	42.85	4.39	Raça: 0.103
Status Sexual	Inteiro	13	17.00	20.50	23.50	27.50	49.50	26.65	2.60	Int: 0.619
	Castrado	107	9.00	22.50	33.00	49.50	240.50	48.42	4.66	SS: 0.174
Grupo	Idade									Int: 0.075
I	< 2 anos	8	28.00	36.00	146.50	207.00	240.50	130.94	31.52	Idade: 0.092
	>= 2 anos	15	17.00	26.00	45.00	148.50	217.50	84.93	18.08	
II	< 2 anos	11	14.00	22.00	23.50	30.50	76.50	30.95	5.33	Idade: 0.867
	>= 2 anos	29	10.00	22.50	33.00	39.00	68.50	33.57	2.95	
III	< 2 anos	15	11.50	18.00	29.00	43.00	63.50	31.93	3.97	Idade 0.115
	>= 2 anos	42	9.00	21.00	28.00	36.50	122.50	33.63	3.2	

Observações: [1]- com raça definida ; [2]- sem raça definida;

Não há interação entre sexo e grupo, visto que as diferenças entre os sexos são similares em todos os grupos (F interação- 0,832). Além disso não houve diferença significativa entre os valores encontrados para machos e fêmeas e suas concentrações de glicocorticoides (p-0,785). Também não há interação entre raça e grupo (F interação- 0,288) e não há diferença significativa entre seus valores de GCM (p-0,103). Com relação ao status sexual também não há interação entre este e os grupos (F interação- 0,619) e nem entre as concentrações de cortisol (p-0,174).

Referente à idade, há indicação que existe interação entre esta e os grupos (F interação- 0,075). Entretanto explorando a diferença entre os gatos jovens e adultos, dentro de cada grupo, não há uma diferença significativa entre eles (GI p-0,092; GII p-0,867 e GII p-0,115). No grupo I foi observada uma tendência a diferença (p- 0.092) (gráfico 05)

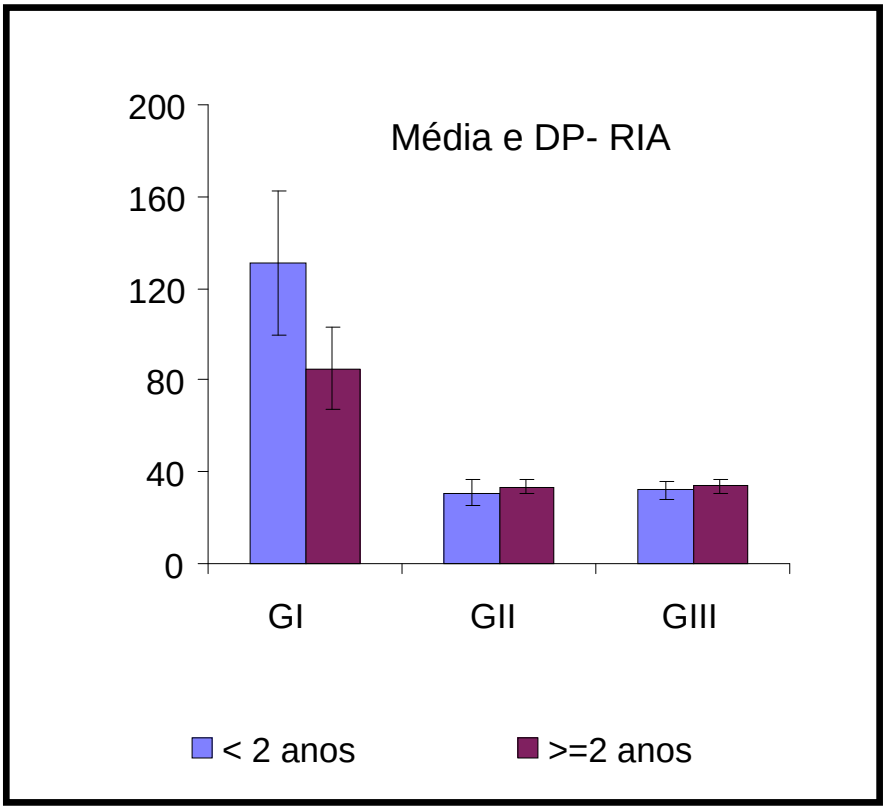


Gráfico 05- Valores de GCM médios e desvio padrão alocados pela divisão em grupos - Radioimunoensaio

4.2 ENZIMAIMUNOENSAIO

Os resultados obtidos através do ensaio enzimático 11- oxoaetiocholanolone serão apresentados a seguir, seguindo as divisões dos grupos.

4.2.1 GRUPO I

Das 92 amostras fecais estudadas no grupo I, temos como valor médio de cortisol GCM **337,71 ng/g = 0,34 ug/g de fezes secas**. O menor valor encontrado nesse ensaio foi do animal Sucki, com 24,86 ηg/g de fezes secas. Em contrapartida, o maior valor encontrado foi de 1602,54 ηg/g de fezes secas, do animal Magnólia, como pode ser observado no gráfico 06.

Os valores encontrados no ensaio, para cada animal, e sua distribuição podem ser vistas no gráfico abaixo (gráfico 06).

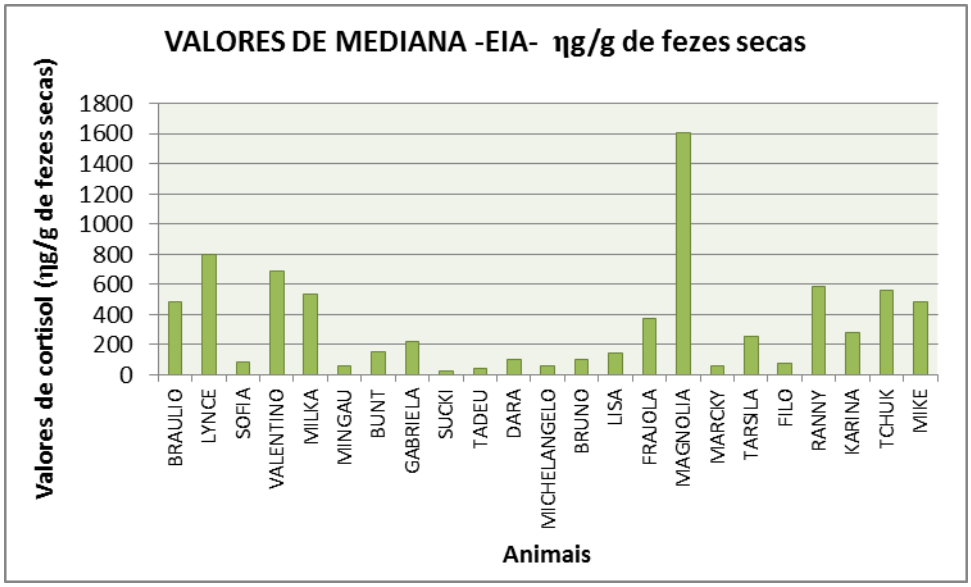


Gráfico 06– Valores de mediana para a dosagem por EIA de metabólitos de cortisol (ηg/g fezes secas) em amostras fecais de gatos que vivem sozinhos

4.2.2 GRUPO II

O valor médio de glicocorticoides encontrado neste grupo foi de GCM= 268,09 ng/g = 0,27 ug/g de fezes secas. Dentre as 160 amostras estudadas, a que revelou maior quantidade de metabolitos foi do animal Fifi, com 1052,61 ng/g de fezes secas. Já o menor valor encontrado neste ensaio foi de 12,95 ng/g de fezes secas do animal Juliano.

A disposição dos valores de cortisol dentro do grupo pode ser visualizada no gráfico a seguir (gráfico 07).

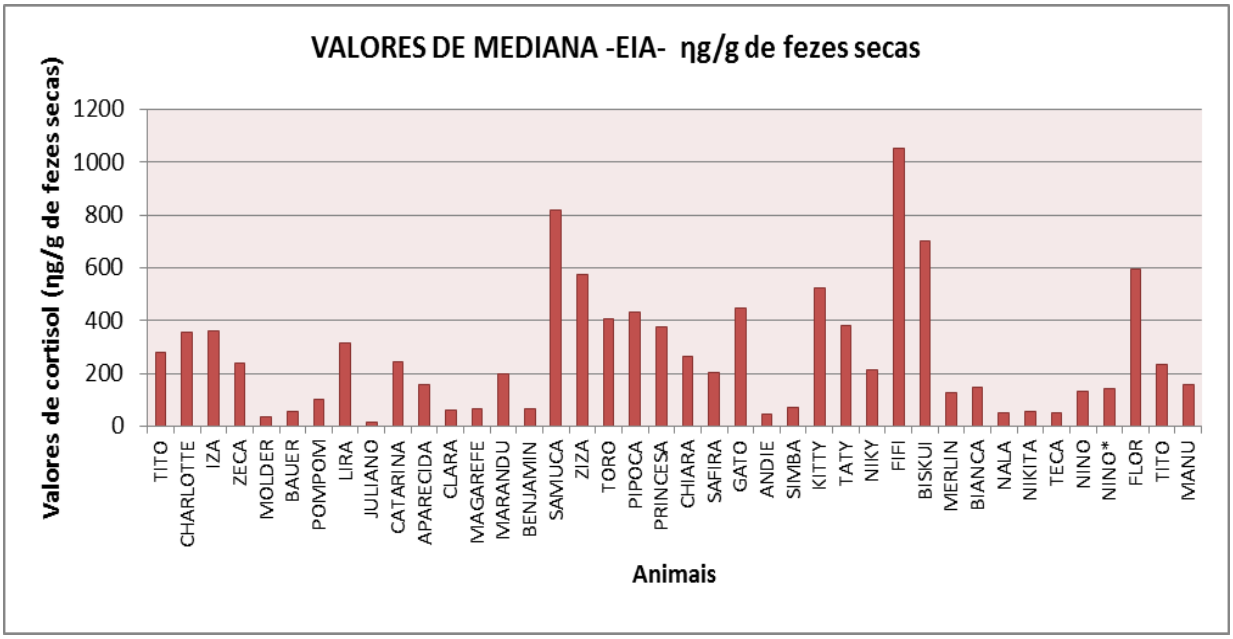


Gráfico 07 – Valores de mediana para a dosagem por EIA de metabólitos de cortisol (ηg/g fezes secas) em amostras fecais de gatos que vivem em duplas

4.2.3 GRUPO III

Dentre os valores obtidos das 226 amostras de fezes do grupo III, o valor médio encontrado foi de GCM= ***314,87*** ng/g de fezes secas = 0,31 ug/g de fezes secas. Os valores correspondentes a cada animal podem ser vistos no gráfico a seguir (gráfico 08).

A menor mensuração observada neste grupo e para este ensaio foi do animal Rubi, com valor de cortisol de 7,02 ng/g de fezes secas. Em contrapartida, o animal Duquesa apresentou o valor de 1261,62 ng/g de fezes secas, sendo o maior valor encontrado dentro do grupo.

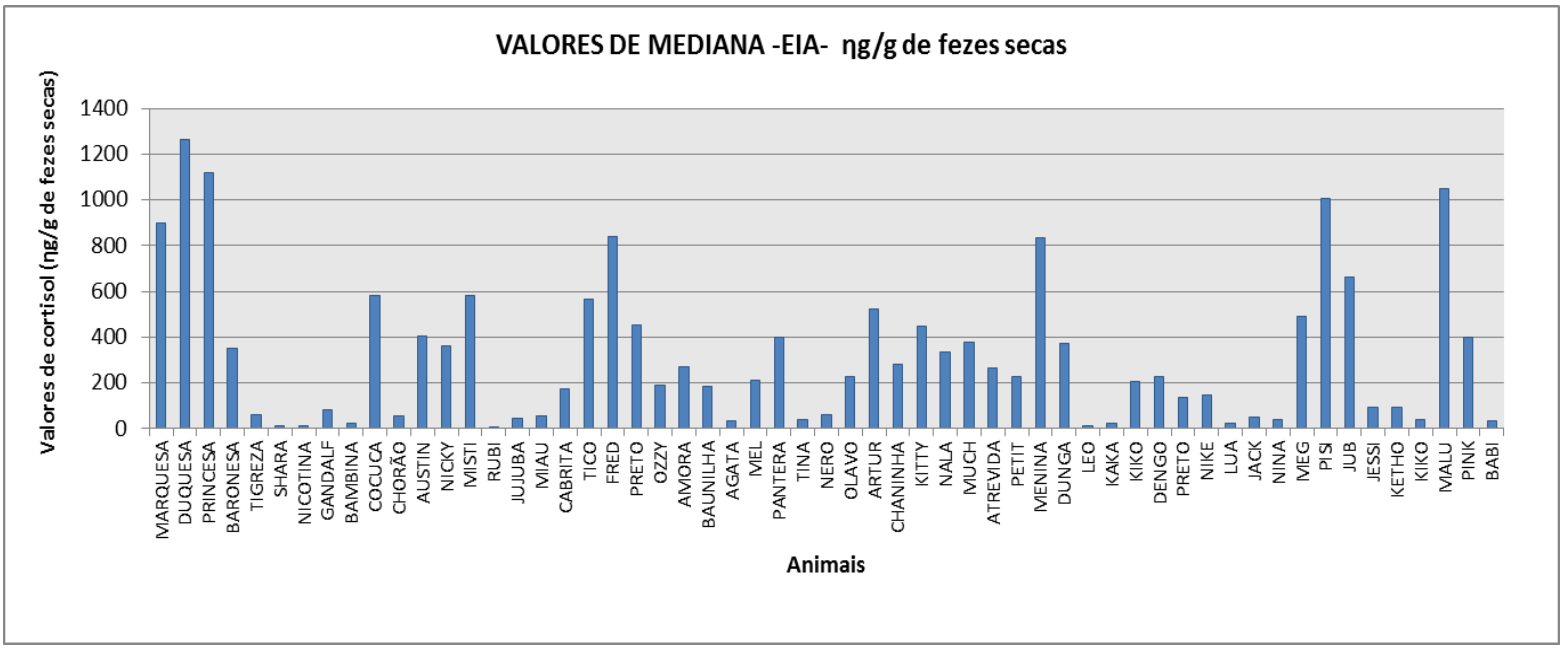


Gráfico 08 – Valores de mediana para a dosagem por EIA de metabólitos de cortisol (ηg/g fezes secas) em amostras fecais de gatos que vivem em trios e/ou quartetos

Conforme os resultados obtidos temos as seguintes análises estatísticas

Tabela 5 - Medidas descritivas do Cortisol - EIA de acordo com grupo e teste obtidos no modelo de efeitos aleatórios para o logaritmo da EIA

Variável	Categoria	N	Min	Q1	Mediana	Q3	Máx	Média	DP	P
Grupo	I	23	24.86	78.47	220.22	531.80	1602.54	337.71	75.61	0.816
	II	40	12.95	66.57	207.48	378.27	1052.61	268.09	37.14	
	III	57	7.02	55.12	227.11	449.96	1261.62	314.87	42.06	

Não houve uma diferença significativa nas concentrações de GCM em função do tamanho do grupo (GI: média=337.71 ng/g, DP= 75.61; GII: média=268.09 ng/g, DP= 37.14; GIII: média=314.87 ng/g, DP= 42.06; F interação=0.20, p=0.816).

Foi realizada uma análise complementar, sendo criada a variável DP_EIA que representa o desvio padrão das quatro medidas de metabólitos de glicocorticoides fecais (derivada das quatro amostras de cada gato). Isso permite-nos explorar as variações “intra-gato” para cada um dos animais dentro dos três grupos, como podemos visualizar na tabela 06 abaixo.

Tabela 6-Medidas descrtivas da variável DP_EIA obtida de acordo com o grupo e teste obtido no modelo de efeito aleatório para o logaritmo DP_EIA

Variável	Categoria	N	Min	Q1	Mediana	Q3	Máx	Média	DP	P
Grupo	I	23	5.53	22.74	91.99	226.46	1028.52	159.49	46.16	0.771
	II	40	10.05	32.21	112.77	176.85	989.27	155.38	29.00	
	III	57	4.76	39.15	81.88	267.25	940.55	211.02	34.45	

Entretanto não houve diferença significativa entre está variável e os grupos estudados (p-0,771).

Referente às demais variáveis, temos os seguintes resultados:

Tabela 7 -Medidas descritivas do Cortisol - EIA de acordo com características demográficas e do teste obtido no modelo de efeitos aleatórios para o logaritmo de EIA

Variável	Categoria	n	Min	Q1	Mediana	Q3	Max	Média	DP	P
Sexo	Fêmea	68	7.02	62.80	235.17	504.97	1602.54	**334.72**	41.03	Int: 0.220
	Macho	52	12.95	62.65	201.24	406.15	1048.76	**263.04**	33.37	Sexo: 0.419
Definição Racial	CRD[1]	23	11.44	123.89	375.99	582.82	1261.62	**407.69**	71.49	Int: 0.794
	SRD[2]	97	7.02	62.27	202.28	382.72	1602.54	**278.99**	29.09	Raça: 0.245
Status Sexual	Inteiro	13	11.44	158.11	231.95	897.73	1261.62	**491.57**	124.55	Int: 0.367
	Castrado	107	7.02	60.48	212.68	407.08	1602.54	**280.83**	26.29	SS: 0.835
Grupo	Idade									Int: 0.039
I	< 2 anos	8	24.86	70.37	431.94	547.22	1602.54	**465.80**	180.35	Idade: 0.555
	>= 2 anos	15	37.62	80.76	153.14	484.09	797.32	**269.39**	64.35	
II	< 2 anos	11	12.95	129.22	241.96	362.00	701.58	**269.20**	58.25	Idade: 0.887
	>= 2 anos	29	36.87	65.13	195.70	382.72	1052.61	**267.67**	46.79	
III	< 2 anos	15	7.02	22.75	49.32	267.93	580.68	**150.17**	46.10	Idade: 0.004
	>= 2 anos	42	13.03	90.66	272.65	522.18	1261.62	**373.70**	51.95	

Observações: [1]- com raça definida ; [2]- sem raça definida;

Com relação ao sexo, não houve interação dentro dos grupos (F interação – 0,220) e nem diferença significativa entre os grupos (p- 0,419). Também não foram observadas diferenças significativas entre os valores de GCM e nem interação entre os grupos com relação à raça (F interação- 0,794; p-0,245) e ao status sexual (F interação – 0,367;p-0,835).

Entretanto no que concerne à idade, pode-se observar que há uma interação entre idade e grupos (F interação- 0,039). Isso nos indica que existe uma diferença significativa entre os jovens (menos de dois anos) e adultos (mais de dois anos), mas não em todos os grupos. Não houve uma diferença significativa entre jovens e adultos no grupo I (p=0.555) e no grupo II (p=0.887). Todavia no grupo III os animais adultos apresentaram valores significantemente mais altos de GCM (p=0.004) (gráfico 09).

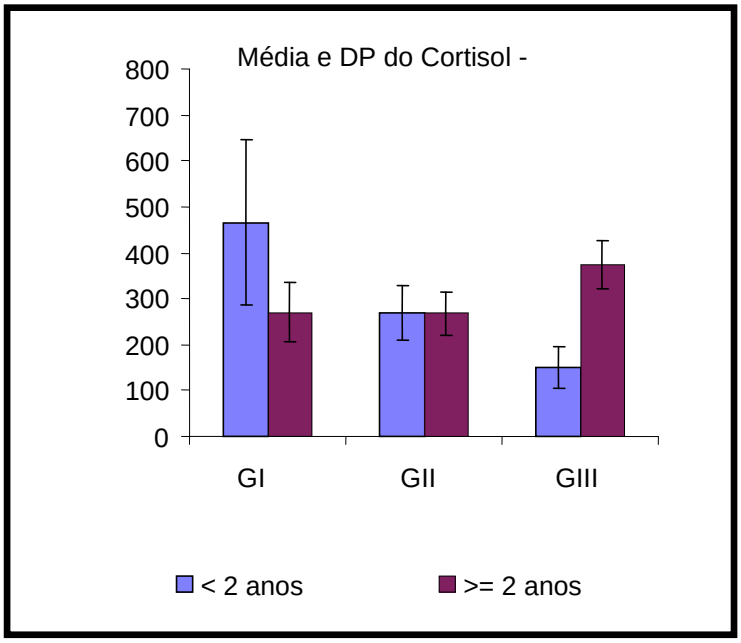


Gráfico 09 – Valores de GCM por enzimaimunensaio –média e desvio padrão dos animais alocados em grupos e comparados quanto a idade

Baseado nessas diferenças encontradas, lançou-se mão de outros testes estatísticos. O coeficiente de correlação Pearson analisa os valores de GCM dos animais desmembrando-os dos grupos, e neste não houve correlação entre idade e valores de cortisol neste teste (r=0.0209; p=0.8205)(gráfico 10).

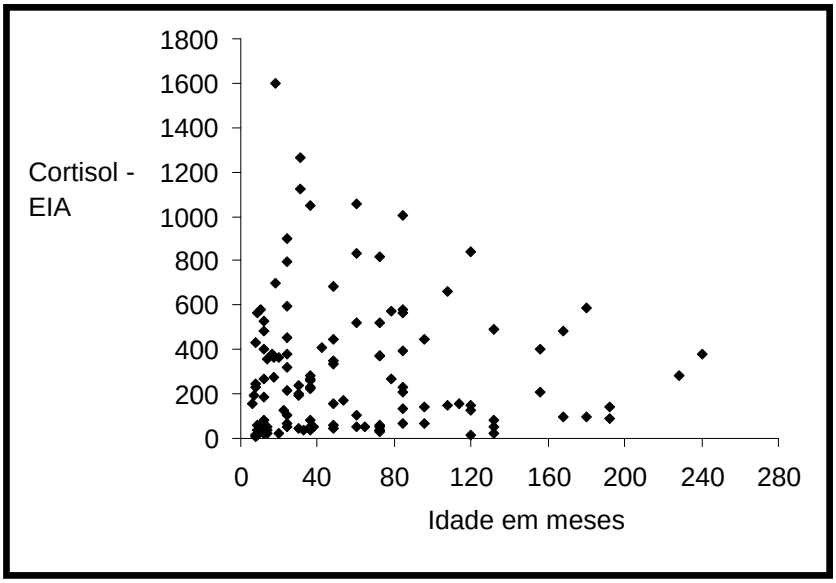


Gráfico 10- Correlação entre valores de glicocorticoides através do EIA e idade em meses

Visto que, segundo o coeficiente Pearson, não há correlação entre a idade e o cortisol, e que há uma diferença significativa entre os valores, lançamos mão de outro teste estatístico. Avaliou-se então jovens GI *versus* jovens GII *versus* jovens GII, e o mesmo foi feito com os adultos. O que foi visto é que não há diferença significativa entre os animais adultos (p=0,762). Já entre os animais jovens houve diferença dentro dos grupos (p=0,046): GI x GII (p=0.643), GI x GIII (p=0.024) e GII x GIII (p=0.054). Assim pode-se concluir que na verdade não são os valores de GCM dos adultos do GIII que estão significantemente mais altos, e sim os valores dos jovens do GIII que estão significantemente mais baixos (gráfico 10).

4.3 RADIOIMUNOENSAIO *versus* ENZIMAIMUNOENSAIO

De acordo com todos os resultados obtidos através dos valores de GCM entre os grupos e também sua disposição quanto as variáveis, avaliou-se a correlação entre RIA *versus* EIA, buscando averiguar se há uma correlação entre ambos. Entretanto, o coeficiente de correlação Pearson (que avalia os gatos independente do grupo que vivem) indicou uma pequena correlação entre valores de glicocorticoides fecais de RIA e EIA (r = 0.1752; p=0.0556) (gráfico 11).

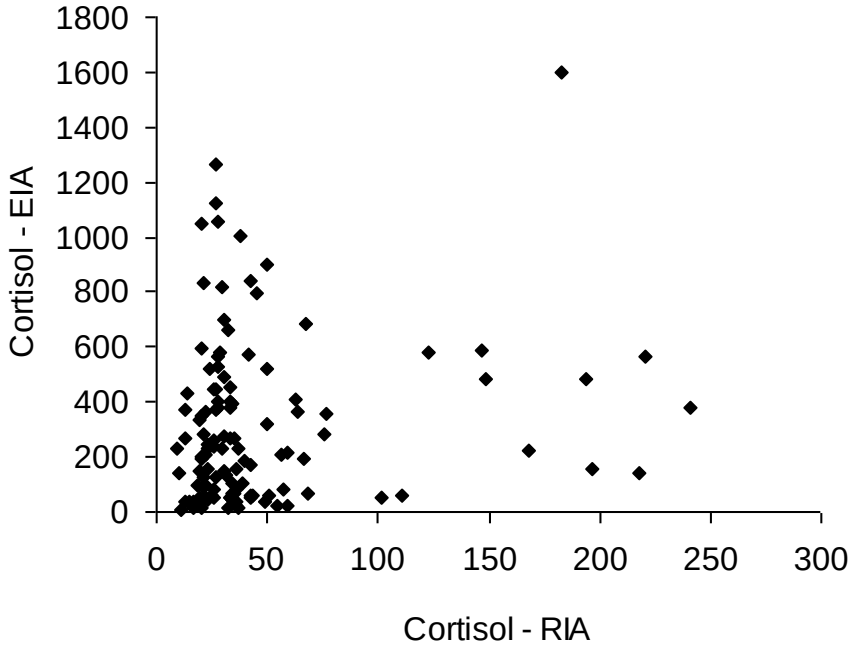


Gráfico 11- Avaliação da relação entre as duas medidas de metabólitos de glicocorticóides fecais (EIA x RIA)

Segundo Young et al(2004), podem haver diferenças significativas entre os ensaios (RIA e EIA) e os sexos. Assim, avaliamos também esta lacuna. Nossos resultados demonstraram um coeficiente de correlação Pearson r=0.170 (p=0.005) para fêmeas e r=0.151 (p=0.029) para machos. Embora haja uma correlação significantemente diferente de zero, esta não é uma correlação forte (gráficos 12 e 13)

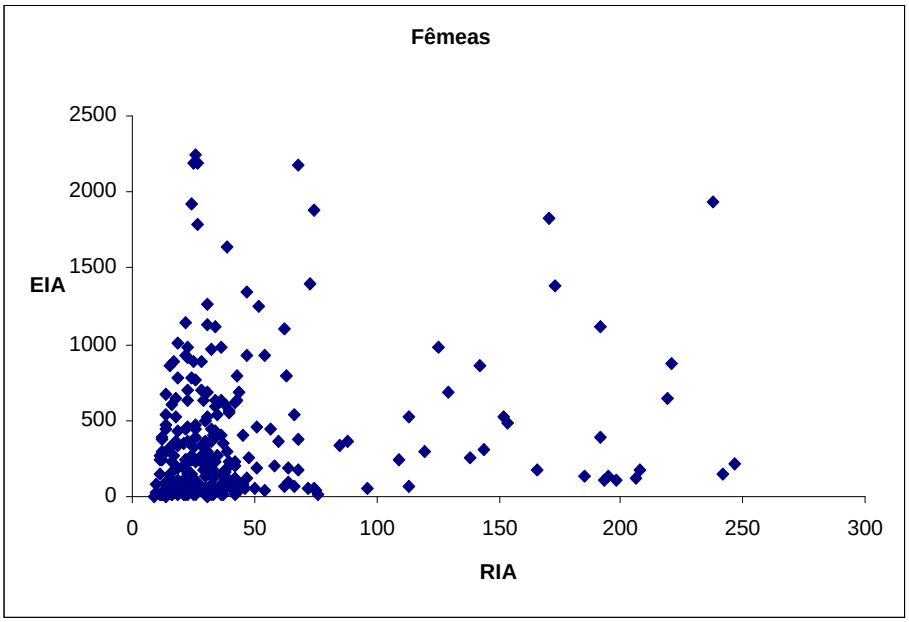


Gráfico 12 – Correlação entre RIA e EIA mensuradas de acordo com o sexo - fêmeas

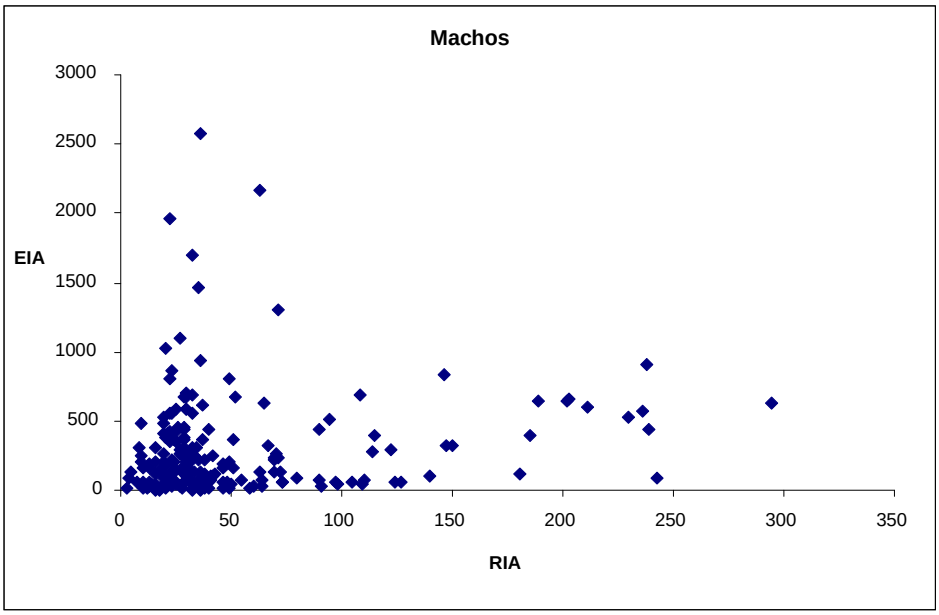


Gráfico 13– Correlação entre RIA e EIA mensuradas de acordo com o sexo – machos

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

5.1 Radioimunoensaio *versus* Enzimaimunoensaio

Os ensaios imunológicos são utilizados para avaliar a atividade do eixo HHA. Existem diferentes tipos de imunoensaios, sendo o radiométrico e o enzimático os dois mais utilizados na endocrinologia comportamental veterinária. O RIA validado para gatos domésticos foi o duplo corticosterona (GRAHAN E BROWN, 1996*)* e o enzimático foi o EIA 11-oxo (PALME et al., 2001; SCHATZ E PALME, 2001). Como ambos ensaios estão mensurando metabólitos de glicocorticoides, e no nosso caso metabólitos do cortisol, nossa hipótese inicial era de que encontraríamos diferenças quantitativas entre os ensaios, mas não qualitativas.

Como pode ser visto nos resultados acima a correlação entre os ensaios enzimático e radiométrico, neste estudo, foi muito pequena. Podemos observa-la através do índice de correlação de Pearson, que apresentou valor de p- 0,0556 (indicativo de pequeno grau de correlação)

Embora o índice de Pearson desvincule os animais dos grupos, observando-se a tendência central dos valores, podemos notar que mesmo quando mantidos alocados em grupos, os ensaios cursam de maneira diferente (i.e. diferem-se qualitativamente também dentro dos grupos). No RIA foi encontrada diferença significativa entre os valores do GI quando comparados aos demais grupos (gráfico 04), a mesma diferença não foi encontrada no ensaio enzimático, onde o valor de GCM não apresentou diferença significativa dentro dos grupos. Caso os ensaios seguissem a mesma tendência, iriam apresentar resultados semelhantes, diferente do que vimos nessa pesquisa.

Com base nos resultados obtidos, rejeitamos nossa hipótese inicial (i.e que os ensaios apresentariam apenas diferenças quantitativas e não qualitativas), e iremos tentar explorar quais hipóteses podem estar envolvidas nessas diferenças.

Como já dito, diferenças quantitativas eram realmente esperadas, já que tratam-se de diferentes ensaios, que fazem uso de anticorpos, reagentes e leitores diferentes, o que poderiam garantir tal diversidade. Além disso sua mensuração é realizada em diferentes unidades de medida, sendo o RIA mensurado em µg/gramas de fezes (GRAHAN E BROWN,

1996; YOUNG et al., 2004) e o EIA em em ηg/g de fezes (i.e 10^{-3} vezes menor que os valores encontrados pelo RIA) (PALME et al., 2001; SCHATZ E PALME, 2001).

Todavia foram encontrados resultados dispares também em relação aos sentidos dos ensaios, e não apenas aos valores quantitativos. Por que isso ocorreu? A principal diferença entre os ensaios referem-se aos tipos de anticorpos utilizados e com o que realmente estão reagindo. Ambos ensaios utilizam anticorpos policlonais, entretanto o ensaio radiométrico parece mensurar , através de reações cruzadas, grupos de metabólitos do cortisol que possuem estrutura semelhante à corticosterona (GRAHAN E BROWN, 1996; YOUNG et al., 2004). Já o EIA 11- oxoaetilcholanolone mensura um grupo específico de metabólitos, o 11,17 dioxoandrostanes (PALME et al., 2001; SCHATZ E PALME, 2001). Acreditamos que o RIA, por realizar sua mensuração através de reações cruzadas, pode estar mensurando não somente metabólitos do cortisol, como também outros esteroides e/ou metabólitos que estejam sendo eliminados pelas fezes (SCHATZ E PALME, 2001; YOUNG et al., 2004). Para nos certificarmos quais metabólitos e/ou esteroides estão sendo realmente mensurados seria necessário lançarmos mão do HPLC, avaliando cada fração encontrada e a identificando.

Embora os imunoensaios demonstrem mensurar metabólitos diferentes, ambos foram validados para mensuração de glicocorticoides fecais para a espécie. Entretanto podemos fazer algumas ponderações sobre a maneira como a mesma foi feita. A validação do RIA foi realizada utilizando-se apenas dois casais de gatos jovens (com idade entre 1 a 3 anos). Já o ensaio enzimático foi validado com dez animais senis (i.e 5 casais entre 9 a 12 anos). Será que nós encontramos resultados divergentes porque utilizamos 120 animais (478 amostras fecais) com idades variadas? Não é sabido se existem alterações metabólicas em função da faixa etária, mas estas são encontradas em função do sexo, (YOUNG et al., 2004, GENARO et al 2007) e podem ser vistas até quando a alimentação é alterada (WASSER et al., 1993).

Ainda com relação à validação há outro item a ser ponderado. Schatz & Palme (2001) e Palme et al (2001) foram os responsáveis pela validação do EIA 11-oxo. Esta foi feita de forma fisiológica e biologica. Assim foi demonstrado que este teste é sensível a alterações do eixo induzidas por drogas (validação fisiológica) (i.e estimulação do eixo com aplicação de ACTH e supressão do mesmo com aplicação de dexametasona) e também em situações de estresse “mais naturais”, como após a vacinação (validação biológica). A validação do RIA duplo corticosterona foi realizada apenas de forma fisiológica (i.e apenas com estimulação do eixo com ACTH) (GRAHAN E BROWN, 1996). A validação biológica avalia a capacidade

do teste em detectar pequenas alterações na atividade adrenocortical e/ou mudanças biologicamente significativas na circulação de glicocorticoides (TOUMA E PALME, 2005). Assim, considerando-se o que é esperado para uma validação adequada (TOUMA E PALME, 2005), os procedimentos de Graham & Brown (1996) deixaram uma lacuna em sua execução. Dessa forma pode-se concluir que "aumentos significativos na atividade adrenocortical" podem ser mensurados pelo RIA, entretanto não o sabemos quando referem-se a pequenas alterações e/ou alterações prolongadas do eixo HHA.

Enfim, podemos atribuir as divergências encontradas entre os testes aos fatores apresentados acima. Até o presente momento ainda não há um teste que seja considerado o "padrão ouro". A aplicabilidade dos testes e sua atualização tem-se dado pela facilidade de cada laboratório em obter os kits de anticorpos, pelos equipamentos disponíveis e principalmente pela habilidade em executa-los. Só valer ressaltar que, por se tratar de inúmeros metabólitos presentes em quantidades muito pequenas, a seleção do anticorpo, do laboratório e do imunoensaio são de extrema importância.

Dentro de cada ensaio foram observadas algumas particularidades interessantes. Como não é possível assegurar qual o teste mais apropriado para a espécie, iremos discutir as peculiaridades encontradas em cada um.

5.2 RADIOIMUNOENSAIO

Ainda não existem valores de referencia para metabolitos de cortisol fecal. Talvez isso seja imputado a difícil tarefa de predizer se um animal está ou não estressado e tomar seus parâmetros como referência. Dessa forma os resultados são comparados traçando-se um paralelo com os demais estudos na espécie.

Young et al (2004) foram, dentro de todas as pesquisas publicadas com radioimunoensaio em felinos domésticos, aqueles que encontraram os resultados mais díspares dentro da espécie. Esses encontraram como valor médio 0,348 µg/g de fezes secas para o macho e 0,7462 µg/g de fezes secas para a fêmea. Esses valores são muito pequenos quando comparados com os demais estudos, incluindo este. Pode-se atribuir tamanha diferença de concentração de glicocorticoides à metodologia utilizada para extração dos metabólitos e /ou ao pequeno número de animais utilizados na amostra (n=2).

Com relação aos resultados encontrados nos demais estudos (GRAHAN E BROWN, 1996; RAMOS et al., 2012), não foram visualizadas grandes variações entre eles. A metodologia utilizada por Ramos et al (2012) foi semelhante a utilizada na presente pesquisa, diferenciando-se apenas no álcool utilizado (etanol x metanol, respectivamente) e na sua concentração (80% x 90%). Ramos e colaboradores (2012) estudaram animais sozinhos *versus* grandes colônias, e não foram encontradas diferenças significativas entre os seus resultados (71,9 µg/g e 59,9 µg/g, respectivamente). O valor médio de metabólitos de cortisol encontrados nesta pesquisa (desconsiderando os grupos) foi de 55,65 µg/g, valor semelhante ao encontrado por Ramos et al (2012). O único resultado divergente entre os referidos estudos foi o encontrado por Grahan & Brown (1996) para os machos inteiros, como veremos adiante.

No estudo conduzido por Grahan & Brown (1996), foram encontradas diferenças significativas entre os valores para machos inteiros (139,7 µg/g) quando comparados com os demais animais (machos castrados - 58,2 µg/g, fêmeas inteiras - 51,1 µg/g e fêmeas castradas- 25,6 µg/g). Os autores haviam atribuído tal elevação ao fato de serem animais do sexo masculino e não castrados, sugerindo que estes se encontravam elevados talvez por se tratarem de animais realmente mais “estressados” que os demais participantes ou que os testículos estariam produzindo algum outro metabólito que reagisse ao ensaio. Genaro et al

(2007) sugere que o eixo HHA pode agir e/ou reagir de forma diferente entre os sexos da mesma espécie. Young et al (2004) também encontrou diferenças entre os sexos em sua pesquisa. Entretanto essas diferenças não foram encontradas por Ramos et al (2012) e também não foram visualizadas no presente estudo. Podemos atribuir essas variações ao pequeno numero de animais utilizados nas demais pesquisas (i.e Grahan & Bronw (1996) utilizaram apenas 4 machos inteiros e 3 castrados e Young et al (2004) utilizaram apenas um casal).

Contudo os valores observados no grupo I desta pesquisa são semelhantes aos encontrado nos machos inteiros do estudo de Grahan & Brown (1996). Acreditamos que não exista correlação entre o sexo e os níveis de cortisol, entretanto o que há em comum entre esses animais? Será que estes estão apresentando valores muito altos? Ou será que os demais estão apresentando valores muito baixos?

Infelizmente pela falta de um valor de referencia não é possível responder com precisão estas perguntas. Contudo, quando foi realizado o recrutamento desta pesquisa, buscou-se animais aparentemente sem “estresse”, seja físico ou comportamental (i.e. animais com bom estado de saúde e sem problemas de comportamento evidentes). Assim, podemos acreditar que os valores encontrados nessas amostras fecais são os mais “próximos” do valor fisiológico. Mas o que há de diferente no grupo I e nos machos inteiros do estudo de Grahan & Brown (1996)?

Como já dissemos, acreditamos que não ocorra correlação entre sexo e cortisol fecal. Entretanto uma característica comum de machos inteiros e que pode ser atribuída aos animais sozinhos, refere-se a exploração e /ou locomoção pelo ambiente (BEAVER, 2005).Animais que vivem sozinhos no ambiente podem explorar livremente o mesmo, sem riscos de interações com outros contactantes. Essa maior atividade pode levar a um amento dos níveis de cortisol, no que poderíamos atribuir como um fator de estresse positivo (arousal). Entretanto, em pesquisa ainda não publicada (RAMOS et al., 2013) foram observados que gatos que vivem sozinhos são mais manipulados, acariciados pelos proprietários, o que pode ser um fator de estresse negativo (distress).

Podemos também pressupor que os valores do grupo I estejam dentro da normalidade, enquanto dos demais grupos estejam abaixo, devido ao estresse crônico da vida em grupo. Os gatos constituem uma espécie tipicamente solitária, apreciando relacionamentos mais distantes. Mesmo com exemplos de comportamentos afiliativos entre co-específicos

(CROWELL- DAVIS,2004) e entre inter-específicos (EDWARDS et al 2007), os felinos ainda apreciam a independência e passam grande parte do seu tempo isolados (BEAVER,2005). Assim conviver em grupos pode ser um fator estressante, mesmo que não hajam comportamentos visíveis aos proprietário que indiquem isso.

Além disso, para avaliar se os animais estão realmente estressados ou não, seriam necessárias associar avaliações comportamentais, assim como observado por Carlstead et al (1993). Este visualizou em animais submetidos a mudanças na rotina (considerados estressados), que os mesmos permaneciam mais tempo escondidos atrás da caixa sanitária, brincavam menos, exploravam menos o ambiente, se higienizavam menos, comiam mais e passavam mais tempo na chão.

Referente às demais variáveis exploradas nesta pesquisa –raça e status sexual- não encontramos correlação entre as mesmas e os valores de cortisol, assim como visto por Ramos et al(2012). As diferenças vistas com relação ao sexo já foram exploradas anteriormente. Nos demais estudos tais variáveis não foram analisadas, talvez por contarem com um pequeno numero de animais participantes. Com relação aos resultados encontrados por Grahan&Brown (1996) no que se refere aos machos castrados, não encontramos nesta pesquisa nenhuma correlação entre cortisol e sexo e nem entre cortisol e status sexual, assim como visto também por Ramos et al (2012). Foi visto uma pequena correlação entre idade e níveis de glicocorticoides nos animais do grupo I ($p= 0.092$). Parece que os animais mais jovens do grupo I possuem valores mais elevados de glicocorticoides que os demais. Acreditamos que esta pequena correlação pode estar ocasionada pelos mesmos fatores que contribuem para que todo o grupo I tenha valores de GCM mais altos, ou seja, que os animais mais jovens estejam se locomovendo mais e/ou explorando mais o ambiente (estresse positivo – arousal) (BEAVER,2005) ou que estão sendo mais manipulados e acariciados pelos proprietários (estresse negativo- distress)(RAMOS et al., 2013 – não publicada)

5.3 ENZIMAIMUNOENSAIO

Referente aos valores de GCM encontrados dentro do nosso estudo, não é possível inferir se nossos participantes estão ou não estressados, visto que não existe um valor de referencia para metabolitos de cortisol fecal, como já visto. O que iremos fazer é traçar um comparativo com os demais estudos realizados na espécie e seus respectivos resultados.

O valor médio encontrado nesse estudo, desconsiderando os grupos, foi de 306,89 ng / g de fezes secas. Palme et al (2001); Schatz & Palme (2001) obtiveram um valor basal de 195,77 ng / g de fezes úmidas e após estimulação do eixo com ACTH obtiveram 591,89 ng / g de fezes úmidas. Nossos resultados são mais elevados do que os encontrados por Palme et al (2001); Schatz & Palme (2001) como basais, entretanto são inferiores aos encontrados após estimulação do eixo. Dessa forma poderíamos afirmar que nossos participantes estão mais estressados? Ou podemos supor que estão menos estressados porque seus valores estão inferiores aos encontrados apos estimulação com ACTH?

Nenhuma dessas perguntas pode ser respondida apenas baseando-se nos valores dos glicocorticoides. As diferenças encontradas nos estudos podem ser ocasionadas por diversas circunstancias, como por exemplo pelas etapas realizadas na extração. Palme et al (2001); Schatz & Palme (2001) mantiveram as amostras 30 minutos na multivortex enquanto em nosso estudo as amostras foram mantidas por apenas 15 minutos, além do que os primeiros adicionaram uma etapa extra, após a primeira extração, com metanol a 100 %. Outra diferença entre os ensaios alude ás concentrações do álcool utilizado na etapa inicial de extração. Nossa pesquisa utilizou metanol a 90%, enquanto Palme et al (2001); Schatz & Palme (2001) utilizaram metanol a 80%. Devido a maior concentração do álcool esperava-se um incremento em 5% nos valores de GCM [1]. Contudo os valores obtidos são superiores ao acréscimo estimado. Uma outra variante observada entre os estudos refere-se a utilização de fezes úmidas por Palme et al (2001); Schatz & Palme (2001) enquanto nos demais estudos, incluindo o presente, foram utilizadas amostras de fezes secas.

---

[1]-Informação verbal fornecida pelo Prof.Rupert Palme em Novembro/2011 na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Viena.

Podemos traçar também um paralelo com outro estudo desenvolvido nesta universidade. Neste foram estudados animais que vivem em colônias (pequenas e grandes) e que apresentam alterações médicas e/ou comportamentais (micção inapropriada por "Spraying" e "Toileting") (RAMOS,2012). Todo o protocolo utilizado em ambos trabalhos (i.e. no referido acima e no presente) foram idênticos, exceto na conservação das amostras. Nossas amostras, após serem recolhidas na residência dos proprietários, eram armazenadas em freezer a -20 $^{o.}$C e eram rapidamente liofilizadas (após uma ou duas semanas de congelamento). Já no estudo conduzido por Ramos (2012) as amostras foram armazenadas em freezer a -80º.C e posteriormente liofilizadas todas de uma única vez.

Os animais do grupo "Spraying" (i.e. apresentavam micção inapropriada na forma de "spraying") apresentaram uma mediana de valores de GCM 517,53 ng / g de fezes. Esses valores encontram-se bem elevados quando comparados com os encontrados em nosso estudo (mediana - 227,11 ng / g de fezes), e são semelhantes aos encontrados por Palme et al (2001); Schatz & Palme (2001) , após estimulação do eixo . Já os animais pertencentes ao grupo "Toileting" (i.e. apresentavam micção inapropriada na forma de "toileting") apresentaram seu valor médio de 355.91 ng/g de fezes. Estes assemelham-se mais aos resultados encontrados na presente pesquisa (média- 306,89 ng/g de fezes).

Ainda referindo-se ao estudo conduzido por Ramos (2012), ambos grupos estudados parecem estar estressados, mesmo porque as alterações de comportamento apresentadas podem ser influenciadas por alguma forma de estresse. Mesmo assim, por não existir um valor de referencia podemos apenas sugerir que os valores encontrados estão elevados, mas não podemos afirmar que estão superiores ao fisiológico. Outro estudo que pode nos servir de guia comparativo foi o realizado por Young e colaboradores (2004). Este obteve como resultado um valor médio de 181,0 ng/g de fezes para seu participante macho e 745,1 ng/g de fezes na fêmea.

Comparando nossos resultados como os demais estudos, podemos notar grande diversidade entre os mesmos. Quais os motivos para tamanha divergência? O que podemos concluir com esses resultados?

As divergências de valores de metabolitos de cortisol iniciam-se dentro de cada animal estudado (i.e dentro do conjunto de quatro amostras individuais), assim como já havia sido

visto nos estudos anteriores (GRAHAN E BROWN, 1996; PALME et al., 2001; SCHATZ E PALME, 2001; RAMOS, 2012; RAMOS et al., 2012). Como não existe um valor basal de referencia para a espécie, não podemos afirmar se tais variações entre os valores estão dentro dos limites fisiológicos esperados ou se os animais em questão estão realmente sob estresse.

Para o nosso estudo foram selecionados apenas os animais que não apresentavam problemas médicos e comportamentais aparentes (sejam conflitos entre os próprios gatos ou comportamentos inapropriados individuais), assim esperávamos encontrar um valor o mais próximo possível do basal para animais "não estressados". Entretanto encontrados médias superiores as vistas por Palme et al (2001); Schatz e Palme (2001) e Young et al (2004), este ultimo apenas para o macho. Acreditamos que tais diferenças podem ser atribuídas, com relação ao estudo conduzido pelos primeiros autores, a idade dos animais selecionados para a pesquisa. No referido estudo foram utilizados dez animais senis, como já dito anteriormente, assim podemos esperar que a idade estivesse influenciando na atividade do eixo HHA. Além do mais existem algumas divergências com relação às etapas de extração e ao uso de fezes úmidas, que poderiam também estar influenciando nos resultados.

Quanto ao estudo conduzido por Young e colaboradores (2004) podemos inferir sobre alguns pontos importantes. Inicialmente neste estudo foi utilizado apenas um casal, assim não podemos afirmar se os valores vistos são os fisiológicos da espécie ou apenas uma variação individual. Além do mais, houve desigualdade no ensaio utilizado, sendo que estes utilizaram o EIA cortisol, e nos demais estudos (incluindo o presente) utilizou-se o EIA 11-oxo, assim podemos estar novamente mensurando metabólitos diferentes.

Referente às demais variáveis pesquisadas – raça e status sexual- não foram encontrados, neste estudo, correlação entre elas e os valores de cortisol fecal. Com relação ao sexo, também não encontramos correlação entre o mesmo e os valores de metabólitos fecais, divergindo dos resultados encontrados por Young et al(2004) , porem como já explicado anteriormente, este utilizou apenas um casal, dificultando as comparações entre os resultados (fisiológico *versus* variação individual). Entretanto dentro das variáveis estudadas, foi possível observar interação entre idade e cortisol fecal.

Foram encontradas diferença significativas entre os valores de GCM nos animais jovens x adultos do grupo III (p=0.004), sugerindo que os animais adultos possuiam valores de cortisol mais elevados que os animais jovens do mesmo grupo. Para confirmar tal resultado foram realizados mais testes estatísticos, como o teste de Pearson, que desvincula os animais

dos grupos pertencentes, e desta vez não foram encontradas diferenças significativas. Em outro teste realizado, foram então comparados os valores de GCM dos animais adultos do GI x GII x GIII, e não foram observadas diferenças significativas. Estas foram encontradas quando foram comparados os valores de glicocorticoides entre os animais jovens do GI x GII x GIII, sendo este ultimo o menor encontrado. Dessa forma, concluiu-se que na verdade não há diferença significativa entre os valores de GCM nos animais adultos, e sim entre os animais jovens.

Essa diferença não era esperada, visto que animais jovens costumam brincar e explorar mais o ambiente (elevando assim os valores de GCM, como visto anteriormente). Acreditamos que devido a presença de outros animais, tais comportamentos podem estar sendo inibidos, entretanto são necessárias mais investigações para tal confirmação.

Infelizmente não foi possível concluir claramente qual é o ensaio mais apropriado para a espécie. Acreditávamos que iríamos encontrar diferenças quantitativas, e nos surpreendemos com as qualitativas. Como não há um outro teste comparativo, e nenhum dos ensaios é considerado “padrão ouro” torna-se impossível no momento julgar qual está correto ou não. Muito particularmente nos parece que os ensaios enzimáticos aproximam-se mais do “ideal”, afinal os mesmos foram validados de forma fisiológica e biológica, e estão mensurando um grupo mais específico de metabólitos de cortisol fecal.

Com relação aos animais e seu estilo de vida- sozinhos ou em pequenas colônias- fica difícil inferir sobre qualidade de vida e bem estar apenas com os valores de GCM. Devemos associa-los a avaliações comportamentais, buscando sinais indicativos de estresse. Além disso não podemos esquecer do estresse crônico, que pode vir mascarado de normalidade, mas que fisiologicamente e comportamentalmente tem seus efeitos deletérios.

Não há na literatura, até o presente momento, nenhum estudo comparativo neste modelo, com grande numero de animais e amostras coletadas. Deixamos uma porta aberta para novas pesquisas, tentando desvendar um pouco mais sobre estresse crônico em felinos domésticos e qualidade de vida.

CONCLUSÃO

6 Conclusão

1- Não houve, nesta pesquisa, correlação entre os ensaios radiométricos (RIA duplo corticosterona) e enzimáticos (EIA 11- oxoaetiocholanolone). Os ensaios aparentam estar mensurando diferentes grupos de metabólitos de cortisol fecal, assim apresentaram diferenças quantitativas e qualitativas;
2- Devido a falta de um teste "padrão ouro" não é possível inferir qual dos dois ensaios realmente faz as mensurações mais fidedignas. Acreditamos que devido às validações realizadas, o ensaio enzimático parece estar mais apropriado;
3- Por não existir um valor de referencia para cortisol fecal em gatos domésticos, não é possível afirmar se os animais estudados estão estressados ou não. Comparando com os demais estudos, acreditamos que os mesmos estejam dentro do valor fisiológico esperado;
4- Mesmo encontrando resultados semelhantes aos dos demais estudos, não podemos afirmar se os mesmos estão ou não estressados, visto que os animais podem apresentar valores normais de cortisol e estarem em estresse crônico.
5- Para avaliar melhor a qualidade de vida dos animais sozinhos e em grupos são necessárias mais pesquisas, associando fatores comportamentais aos fisiológicos estudados no presente estudo. Afora isso, são necessários ainda mais investigações sobre o comportamento do eixo hipófise-hipotálamo-adrenal e o estresse crônico;

REFERÊNCIAS

BEAVER, B. V.(2005) **Feline Behaviour: a guide for veterinarians**. 2. ed. New York: Elsevier Inc.

BEERDA, B.; SCHILDER, M. B. H.; BERNARDINA, W.; JARAM, V. H.; DE VRIES, H. W.; MOL, J. A.(1999) Chronic stress in dogs subjected to social and spatial restriction II - Hormonal and Immunological responses. **Physiology and Behavior**, v. 66, n. 2, p. 243-254.

BROWN,J.L.; WALKER,S.L.; MOELLER,T. (2004) Comparative endocrinology of cycling and non-cycling Asian (*Elephas maximus*) and African (*Loxodonta africana*) elephants. **General and Comparative Endocrinology**, v.136, p- 360-370.

BURDON,R.H.; KNIPPENBERG,P.H.; CHARD,T. (1990) **Laboratoty Techniques in Biochemistry and Molecular Biology – An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques**. 4o. ed, Elsevier.

CARLSTEAD,K.; BROWN,J.L.; STRAWN,W.. (1993) Behavioral and physiological correlates of stress in laboratory cats. **Applied Animal Behaviour Science**, v.38, p. 143-158.

COCKREM,J.F..(2005) Conservation and behavioral neuroendocrinology**. Hormones and Behaviour,** v.48, p- 492-501

CROWEL-DAVIS,S.L.; CURTIS,T.M.; KNOWLES,R.J.(2004) Social organization in the cat: a modern understanding. **Journal of Feline Medicine and Surgery** , v. 6, p. 19-28.

DEHNHARD,M.; SCHREER,A.; KRONE,O.; JEWGENOW,K; KRAUSE,M.; GROSSMANN,R..(2003) Measuriment of plasma corticosterone and fecal glucocorticoid metabolites in the chicken (Gallus domesticus), the great cormorant (Phalacrocorax carbo) and the goshawk (Accipiter gentilis).**Gen. Comp. Endocrinol**, v.131(3), p.345-52.

EDWARDS,C.; HEIBLUM,M.; TEJEDA,A.;GALINDO,F..(2007)Experimental evaluation of attachment behaviours in owned cats. **Journal of Veterinary Behaviour: clinical applications and research** 2, v. 4, p. 119-12

FUJIHARA, C.J. (2008) **Validação de método não- invasivo para análise de hormônios ligados ao estresse em Papagaio Verdadeiro (*Amazona Aestiva*)**- Dissertação para obtenção de título de Mestre, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita”, Botucatu, 113 p.

GENARO,G.; MORAES,W.; SILVA,J.C.R.; ADANIA,C.H.; FRANCI,C.R..(2007) Plasma hormones in neotropical and domestic cats undergoing routine manipulations. **Research in Veterinary Science**, v.82,p. 263-270.

GOMW, E.N.D.S.,(1979) **PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO CLINICA DO RADIOIMUNOENSAIO DE SOMATOMEDINA B SÉRICA HUMANA. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE RADIOIODAÇAO ENZIMATICA –** Dissertação para obtenção do titulo de mestre – Instituto de energia Nuclear, Universidade de São Paulo

GRAHAN,L.H.; BROWN,J.L. (1996) 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.

GUYTON,A.C.; HALL,J.E. (1997) **Tratado de Fisiologia Médica**, 9º. Ed;

HARPER,J.M.; AUSTAD,S.N.. (2001) Effect of Capture and Season on Fecal Glucocorticoid Levels in Deer Mice (*Peromyscus maniculatus*) and Red-Backed Voles (*Clethrionomys gapperi*). **General and Comparative Endocrinology**, v.123, p- 337-344.

HERNÁNDEZ-JÁUREGUI,D.M.B.; MALDONADO,F.G.; PÉREZ,R.A.V.; PARDO,M.R.; ALUJA,A.S. (2005) Cortisol in saliva, urine, and feces: non-invasive assessment of wild mammals. **Veterinaria Mexico**, v.36, n.3, p.325-337.

HIEBERT,S.M.; RAMENOFSKY,M.; SALVANTE,K.; WINGFIELD,J.C.; GASS,C.L.. (2000). Noninvasive Methods for Measuring and Manipulating Corticosterone in Hummingbirds. **General and Comparative Endocrinology**, v.120, p. 235-247.

HOTZEL,M.J.; MACHADO FILHO,L.C.P. (2000). Estresse,fatores estressores e bem estar na criação animal. **Anais do XVIII Encontro Anual de Etologia**, v.18, p-25;

KEAY,J.M., SINGH,J., GAUNT,M.C., KAUR,T. (2006) – Fecal Glucocorticoids and their Metabolites as Indicators of Stress in Various Mammalian Species: a Literature Review. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.37,p.234-244;

LICHTSTEINER,M.; TURNER,D.C.. (2008) Influence of indoor-cat group size and dominance rank on urinary cortisol levels. **Animal Welfare**, v. 17, p 215-237.

MCDONALD D.W., APPS,P.J.; CARR,G.M.; KIRBY,G. (1987) Social dynamics, nursing coalitions and infanticide among farm cats, *Felis catus*. **Advances in Ethology (supplement to Ethology)**, v. 28, p. 1-66.

MCKENZIE,S.; DEANE,E.M..(2005) Faecal corticosteroid levels as an indicator of well-being in the tammar wallaby, *Macropus eugenii*. **Comparative Biochemistry and Physiology – Part A – Molecular and Integrative Physiology,** v.140, p- 81-87

MORMÈDE, P.; ANDANSON, S.; AUPÉRIN, B.; BEERDA, B.; GUÉMENÉ, D.; MALMKVIST, J.; MANTECA, X.; MANTEUFFEL, G.; PRUNET, P.; VAN REENEN, C. G.; RICHARD, S.; VEISSIEN, I. (2007) Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. **Physiology and Behavior**, v. 92, n. 3, p. 317-339.

MÖSTL,E.; PALME,R. (2002): Hormones as indicators of stress. **Dom. Anim. Endocrinol.,** v.23, p. 67-74.

NOGUEIRA,G.P.; SILVA, J.C.R.; (1997) Plasma cortisol levels in captive wild felines after chemical restraint. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** , v 30, n.11,p.1359-1361.

PALME,R.,RETTENBACHER,S.,TOUMA,C.,ELBAHR,S.M.,MÖSTL,E.(2005).Stress Hormones in Mammals and Birds – Comparative Aspects Regarding Metabolism, Excretion and Noninvasive Measurement in Fecal Samples. **New York Academy of Sciences**, v.1040, p. 162-171;

PALME.R.; SCHATZ,S.; MöSTL.E.(2001) Effect of vaccination on fecal cortisol metabolites in cats and dogs**. Dtsch Tierarztl Wochenschr** , v10, p 23-25;

RAMOS,D..(2012) **Evaluation of medical, behavioural and physiological aspects of domestic cats (*Felis catus*) with inappropriate urination**. Tese apresentada para obtenção de título de doutor. Universidade de São Paulo.

RAMOS,D.; ARENA,M.N.; RECHE JUNIOR,A.; DANIEL,A.G.T.; ALBINO,M.V.C.; VASCONCELLOS,A.S.; VIAU,P.; OLIVEIRA,C.A.(2012). Factors affecting faecal glucocorticoids levels in domestic cats (*Felis catus*): a pilot study with single and large multi-cat households. **Animal Welfare**, v.21, p. 285-291;

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

SCHERIFF,M.J.;DANTZER,B.;DELEHANTY,B.;PALME,R.; BOONSTRA,R. (2011). Measuring stress in wildlife: techniques for quantifying glucocorticoids. **Oecologia**, v.166, p. 869-887;

TEIXEIRA,G.R.; MARTINS,O.A.; FIORUCI,B.A.; MELLO JUNIOR,W.; PINHEIRO,P.F.F.; KREMER,R.; MARTINEZ,F.E.(2008). Respostas biológicas ao estresse. **PubVet**,v.2 (acessado dia 20/02/2011)

TOUMA, C.; PALME, R.(2005) Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: the importance of validation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1046, p. 54-74.

TIZART, I.A.. (2002) **Imunologia Veterinária – Uma Introdução**. 6º. Edição, São Paulo, Editora Roca;

UMAPATHY,G.;KUMAR,V.;WASIMUDDIN.;KABRA,M.;SHIVAJI,S.(2013) Detection of pregnancy and fertility status in big cats using an enzyme-immunoassay based on 5a-pregnan-3a-ol-20-one. **General and Comparative Endocrinology,** v. 180, p. 33–38.

VERBEKE,G.; MOLENBERGHS,G..(2009) Linear Mixed Models for Longitudinal Data. Springer Verlag New York NY;

VIAU,P.; FELIPPE,E.C.G.; OLIVEIRA,C.A. (2005). Quantificação de esteróides fecais de fêmeas de onça-pintada (Panthera onca) mantidas em cativeiro: validação da técnica. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 42, n. 4, p. 267-275.

WASSER,S.R.; HUNT,K.E.; CLARKE,C.M. (2002) Assessing stress and population genetics through noninvasive means. In: AGUIRRE, A.A.; OSTFELD,R.S.; TABOS,G.M.; HOUSE,C.; PEARL.M.C.(Eds) **Conservation Medicine** – Ecological Health in Practice. New York : Oxford University Press, p 131-144.

WASSER,S.K.; SEWALL,G.; SOULES,M.R..(1993) Psychosocial stress as cause of infertility. **Fertility and Sterility**, v.3, n.59, p 685-689.

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

APÊNDICES E ANEXO

Apêndice A- Cartaz de recrutamento para o projeto

Como anda o relacionamento entre os seus gatos?

Os gatos domésticos são considerados animais pouco sociais. A vida em grupo gera restrição espacial e contato próximo, o que é bastante estressante para alguns indivíduos.

Adoraríamos conhecer como se relacionam os gatos em sua casa!

Somos veterinários da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo interessados no estudo do comportamento e do bem-estar de gatos domiciliados que vivem em grupos. Precisamos da sua ajuda!

Se você possui de 3 a 4 gatos, entre em contato conosco. A participação em nossa pesquisa é gratuita e lhe permitirá conhecer melhor os seus bichanos e lidar com problemas decorrentes da vida grupal.

Dra. Daniela Ramos Tel: 93379910

Email: daniela.ramos@usp.br

Dra. Priscila Fragoso Tel: 86350411

Email: prifragoso@usp.br

Supervisão: Prof. Archivaldo Reche Junior

Apêndice B- Correspondência eletrônica – convite para participação no projeto

Olá, _____.

Tudo bem?

Nós, Daniela Ramos e Priscila Fragoso somos médicas veterinárias pós graduandas da faculdade de veterinária da USP. Pesquisamos principalmente o comportamento de gatos domésticos e contamos sempre com a ajuda dedicada e extremamente valiosa dos proprietários, que enriquecem nossas pesquisas a medida que nos contam as interessantes estórias de seus gatos.

Escrevemos para falar-lhes a respeito de uma pesquisa que estamos dando inicio aqui na USP, aproveitando para pedir-lhes ajuda.

Estamos avaliando o comportamento social e os niveis de estresse comparativamente em gatos que vivem sozinhos, em duplas e em trios/quartetos. Sabemos que a vida em grupo é estressante para muitos gatos e gostariamos de estudar o assunto mais a fundo. Para isso, usamos tecnicas laboratoriais modernas para avaliar, atraves de 4 amostras de fezes de cada gato, coletadas individualmente, os niveis de algumas substancias (ex: cortisol) sabidamente associadas ao estresse. Assim, temos uma "foto" dos niveis diarios de estresse daquele gato, naquele dado momento.

Como vocês tem _____ gatos e estamos muito precisando de proprietarios com esse numero de animais, gostariamos de convida-los a participarem da pesquisa.
Não há custo nenhum em participar da pesquisa. Inclusive, ao irmos até a sua casa buscar as amostras, podemos orienta-lo em relação ao comportamento dos seus gatos, caso você tenha questões a serem esclarecidas ou problemas a serem relatados.

O que vocês acham?

um abraço e obrigada!

Daniela e Priscila

Apêndice C - Ficha de recrutamento – "Check in"

FICHA DE RECRUTAMENTO

Proprietário - nome:_____email: _____

Endereço e telefone: _____

Número de gatos na casa:_____

CHECKLIST:

NÃO tem menos de 6 meses de idade (nenhum dos gatos)	
GATO (s) vive com o dono, nesta mesma residência, a pelo menos 4 meses	
NÃO convive com outros animais de outra espécie	
NÃO tem acesso livre ao lado de for a da casa (nenhum dos gatos)	
NÃO faz uso de medicação (nenhum dos gatos)	
NÃO apresenta doença ou desordem orgânica (nenhum dos gatos)	
NÃO pretende mudar-se, viajar, reformar a casa ou INTRODUZIR um novo membro na família (humano ou animal) durante o período de coleta das amostras	
NÃO pretende levar os gatos ao veterinário durante o período de coleta das amostras (ex: para vacinação)	
NÃO prevê que alguma gata entre no cio durante o período de coleta das amostras	
CONSEGUIRÁ identificar e coletar as amostras de cada gato, após não mais do que 4 horas da defecação. ACEITA coloca-las em freezer imediatamente e lá mantê-las até a visita do pesquisador	

Grupo alocado:_____ *(I: sozinho; II: dupla; III: trio/quarteto)*

Gato – nome, sexo, status sexual e idade:

GATO 1: _____

GATO 2: _____

GATO 3:_____

*GATO 4:*_____

Período da coleta:_____

Apêndice D – Ficha de acompanhamento do período de coletas – "Check Out"

FICHA DE ACOMPANHAMENTO

Dono - nome:_____email: _____

Número de gatos na casa:_____

Grupo alocado:_____

Data das 4 coletas :

GATO 1: _____

GATO 2: _____

GATO 3:_____

*GATO 4:*_____

Descrição da estratégia de coleta das amostras:

_____

Algum problema durante a coleta das amostras?

_____

Algum evento estressante durante o período de coleta das amostras?

_____

Alguma doença ou desordem orgânica acometeu um ou mais gatos durante o período de coleta das amostras?

_____

Alguma fêmea entrou em período de cio durante o tempo de coleta das amostras?

_____

Data da visita (para coleta das amostras):_____

Dept. Biomed. Sciences/Biochemistry
University of Veterinary Medicine
Veterinärplatz 1, A-1210 Vienna, Austria

vetmeduni vienna

Measuring faecal steroid metabolites with enzyme immunoassays (EIA) on microtitre plates using biotinylated steroids as labels

Contents:

I. Extraction of steroids 2

II. Measurement with EIA
1. Buffers and solutions 3
2. Coating of microtitre plates (MTP) 4
3. Reagents (stock solutions) 4
4. Working dilutions 4
5. Assay procedure 5
6. Absorbance measuring 6
7. Large scale analysis - special offer! 7
8. How to validate an EIA for a given species 8
9. EIAs, produced by our working group, to measure glucocorticoids (or their metabolites) 9
10. How to calculate the dilution factor 10

Contact:

Associate Prof. Dr. E. Möstl
FAX: +43-1-25077-4190
Phone: +43-1-25077-4102
E-mail: Erich.Moestl@vetmeduni.ac.at

Associate Prof. Dr. R. Palme
FAX: +43-1-25077-4190
Phone: +43-1-25077-4103
E-mail: Rupert.Palme@vetmeduni.ac.at

Version: Nov. 2010

Abbreviations: Antibody (AB), biotin label (BL), double destilled water (DDW), microtitre plate (MTP)

I. Extraction

It is advisable to freeze samples immediately after defecation (in order to prevent possible degradation of metabolites by bacterial enzymes), and store them at -20°C until analysis.

Weigh 0.5 g of wet faeces
Add 5 ml 80% methanol* (premixed; or 4 ml 100% methanol and 1 ml water)

(80% methanol gave the highest yield of naturally occuring metabolites after administration of radiolabelled glucocorticoid in all species examined so far: sheep: Palme et al., 1997; horse: Möstl et al., 1999; carnivores: Schatz & Palme, 2001; for references, see Info-letter)

In some animals (e.g., rodents) it may be necessary to weigh a smaller portion (0.05 or 0.1 g) and add an adequate amount of alcohol (e.g., 1 ml, 80%, Touma et al., 2003, 2004)
In birds, we recommend extracting droppings with 60% methanol, as the metabolites are more polar.

Vortex for 30 min on a multivortex or 1-2 min on a handvortex and centrifuge (2500 g; 15 min).

*(we use methanol for analysis; No. 1.06009.2500, Merck)

a) When high amounts of metabolites are present in the faeces:
Dilute an aliquot of the supernatant with assay buffer (1:10), and store it at -20°C until analysis with EIA.

In most species this simple extraction procedure (=suspension) will suffice.
(e.g., Palme et al., 1997, 1999 etc.)

b) However, if only small amounts of metabolites are present (e.g., horses - Merl et al., 2000) further steps have to be included:

Transfer 1 ml of the supernatant into a new vial
add 5 ml diethylether + 0.25 ml 5% $NaHCO_3$ (Merck 106329)
vortex for 10 sec., centrifuge and freeze
transfer supernatant into new vial and dry it down (under a stream of N_2 and/or in a heat block set at ~60°C), redisolve in 0.5 ml EIA buffer
50 µl are used for the EIA (dilution factor = 110)

II. Measurement with EIA

1. Buffers and solutions

1.1. Coating buffer

1.59 g Na_2CO_3 (Merck 106392 or Sigma S-7795)
2.93 g $NaHCO_3$ (Merck 106329 or Sigma S-6014)
dissolve and fill up to 1 l with DDW, adjust to pH 9.6 with (about 10 ml) HCl (1 mol/l)
filter through Sep-Pak® C18 (see 1.3.1.)

1.2. HCl (1 mol/l)

920 ml DDW + 80 ml 37 % HCl (Merck 100317 or Sigma H-1758)

1.3. Assay buffer

2.42 g Trishydroxyaminomethane (Merck 108382 or Sigma T-1503), 20 mmol/l
17.9 g NaCl (Merck 106404 or Sigma S-9625), 0.3 mol/l)
1 g Bovine serum albumin (Sigma A-4503)
1 ml Tween 80 (Merck 822187 or Sigma P-8074)
dissolve and fill up to 1 l with DDW and adjust to pH 7.5 with (about 17 ml) HCl (1 mol/l)
filter through Sep-Pak® C18 (see 1.3.1.)

1.3.1. Filtration of buffer through Sep-Pak® C18

Sep-Pak® classic C18 cartridge (360 mg; Waters WAT051910)
rinse with 5 ml methanol (Merck 106009), followed by 10 ml DDW (done by hand with a syringe)
connect column to tubing of peristaltic pump (flow rate of 2 to 10 ml/min)
discard the first 10 ml of the filtrated buffer,
collect buffer in clean bottle

1.4. "Second" coating buffer

3.146 g Trishydroxyaminomethane (see 1.3.)
23.3 g NaCl (Merck 106404 or Sigma S-9625)
13 g BSA (Sigma A-4503)
1.3 g Sodium azide (Merck 106688)
dissolve and fill up to 1.3 l with DDW and adjust to pH 7.5 with (about 40 ml) HCl (1 mol/l)
filter trough SEP-PAK C18 (see 1.3.1.)

1.5. Washing solution

0.5 ml Tween 20 (Merck 822184); add 2.5 l DDW

1.6. Substrate buffer for peroxidase

1.36 g Sodium acetate (Merck 6267) = 10 mmol/l
dissolve and fill up to 1 l with DDW and adjust to pH 5.0 with (~8 ml) 5 % citric acid (Merck 100244)

1.7. Enzyme solution for Streptavidin-reaction

30 ml assay buffer (see 1.3.)
+ 0.001 ml Streptavidin-POD-conjugate (=0.5 U; Roche 11 089 153 001, 500 U)
mix on a magnetic stirrer a few minutes before use
(the working solution has to be prepared immediately before use!)

1.8. Substrate solution for peroxidase

30 ml of substrate buffer 1.6.
+ 0.5 ml 3,3',5,5'-Tetramethylbenzedine (0.4 %) - Store in a dark bottle!
(0.4 % = 0.4 g [Fluka 87748] in 100 g Dimethylsulfoxide [Fluka 41641])
+ 0.1 ml H_2O_2 (0.6 %; 0.3 ml H_2O_2 [35 %, Merck 108600] + 17.5 ml DDW)
mix gently on a magnetic stirrer a few minutes before use
(the working solution has to be prepared immediately before use!)

1.9. Stop reagent: 2 mol/l H_2SO_4

900 ml DDW + 100 ml H_2SO_4 (95-97 %; Merck 100731)

2. Coating of microtitre plates with Protein A

For one MPT, prepare a solution of 50 µg Protein A (Sigma P-7837; available in portions of 5 mg) dissolved in 25 ml coating buffer (see 1.1., 2 µg Protein A/ml).
Dispense 0.25 ml/well of diluted Protein A to the MTP (F96 MaxiSorp, No. 442404, Co. Nunc, Denmark).
Incubate the plate at room temperature overnight.
Discard the solution and refill each well with 0.3 ml "second" coating buffer (see 1.4.)
Cover the filled MTP with parafilm and dust cover (Nunc 264623), and keep it at room temperature until use.
You can use the MTP after 3 hours. Store the plates no longer than 4 weeks at room temperature.
(Blot plates dry and freeze them at -20°C for longer storage.)

3. Reagents (stock solutions; relevant only in our lab)

Keep all stock solutions frozen at -20°C until use.
Waterproof colour label marked on small vial indicates different content as follows:

Blue: Antibody (AB)
Red: Biotin-labelled steroid (BL)
Green: Standard

Dilute 0.01 ml of a stock solution (1 mg steroid per ml methanol) with 20 ml of assay buffer.
Mix for 2 minutes in the supersonic bath, wait 3 hours and fill portions of 0.05 ml into new vials.
One vial contains 25,000 pg of the respective steroid.

4. Working dilutions

4.1. Standard

Dispense 0.15 ml of assay buffer to one portion of standard vial, shake and wait 20 minutes.
Dilute this solution 1 : 2.5 seven times. Mix well after each step *(500 pg till 2 pg per 0.01 ml).*
In our lab, this is done with a Hamilton Microlab dispenser 1000 (0.09 ml standard + 0.135 ml assay buffer).
Alternatively, you may take the whole portion of the standard vial (0.05 ml) with the 0.15 ml assay buffer, and add another 2.3 ml assay buffer (you have to transfer everything to a larger vial). This results in a concentration of 500 pg per 50 µl assay buffer, which needs to be further diluted (1:2.5; 1 ml + 1.5 ml buffer).

In case of very sensitive assays, make 9 dilutions and omit the first two *(80 pg till 0.3 pg per 0.01 ml).*
Standard, antibody and biotin label solution have to incubate 20 minutes before you can work with them.

4.2. AB and BL

See special labelling for each individual EIA.

EIAs available for glucocorticoid metabolites:
See page 9.

EIAs available for oestrogens and gestagens/androgens' metabolites: Please ask!

EIA working place in our lab

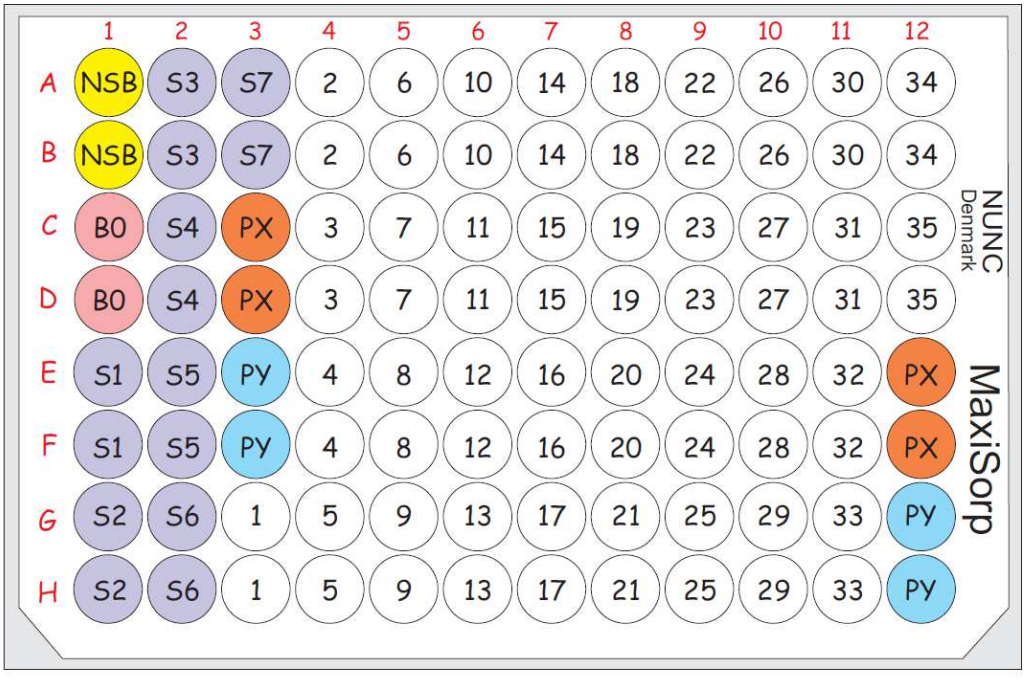
5. Assay procedure

5.1. Plate washing

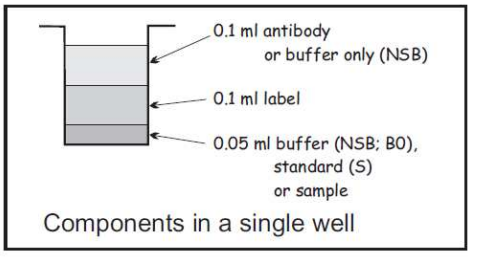
Before use, wash coated MTP (see 2.) three times with washing solution (1.5.).
Remove the rest of liquid by blotting the MTP on paper towels.
Do not touch the underside of the plate.

5.2. Pipetting of standards, pool and samples

Dispense assay buffer for nonspecific binding (NSB) and zero binding (0), standards (4.1.), pool X and Y (PX, PY), and sample into the MTP (see Fig. below) prepared earlier (5.1.). We use the Hamilton Microlab dispenser 1000. It takes 0.01 ml from each sample and adds 0.04 ml assay buffer to dispense a total of 0.05 ml (but you can also prepare the standard concentrations per 50 µl as previously described and add that by hand).



Example of arrangement of standards, pools and samples on the MTP



Components in a single well

5.3. Dispensing of BL

Dispense 0.1 ml biotin-labelled steroid into each well.
For all pipetting steps, use a multi-pipette.

5.4. Dispensing of AB

Dispense 0.1 ml antibody solution into each well.
(Attention: In case of NSB use assay buffer instead of AB.)

Cover the MTP with parafilm and dust cover (Nunc 264623), shake (mild) the MTP overnight at 4°C.

5.5. MTP washing after incubation
Decant incubated MTP, and wash the MTP four times with cold (4°C) washing solution (1.5).

5.6. Streptavidin reaction
Dispense 0.25 ml of enzyme solution (see 1.7.) into each well and incubate the covered plate for 45 minutes at 4°C on a MTP-shaker.

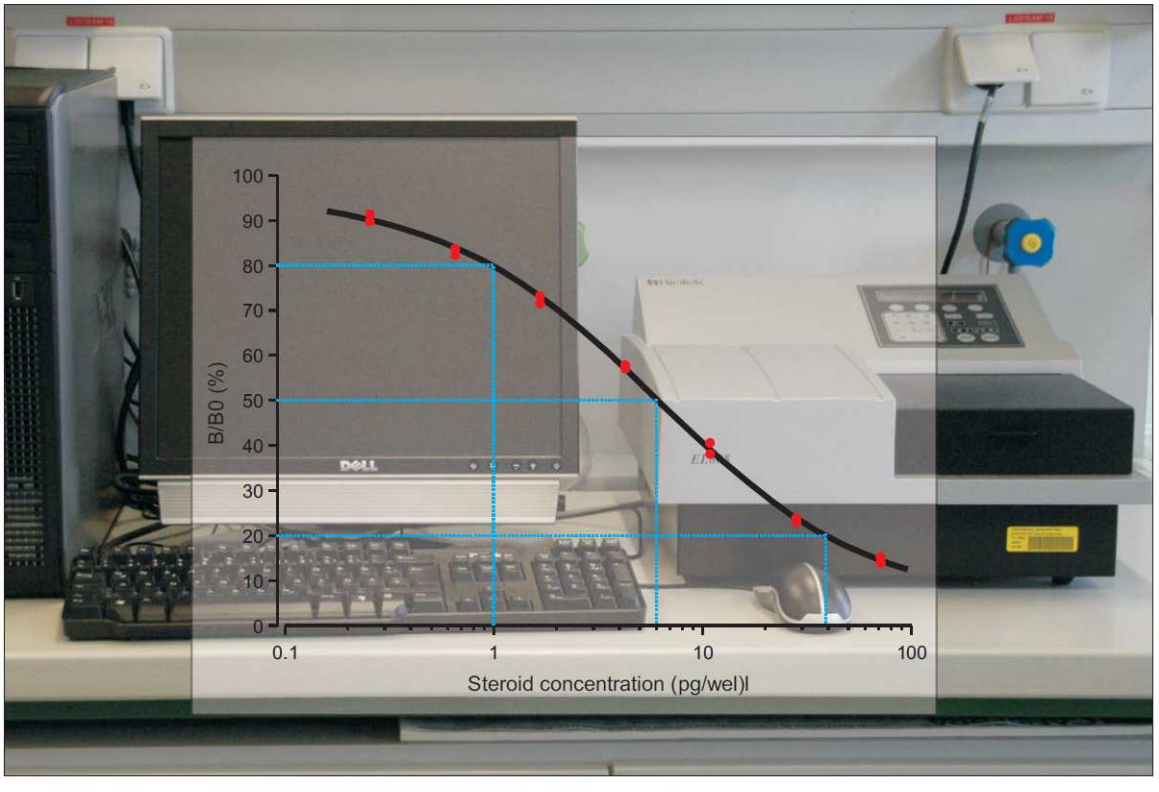
5.7. see 5.5. (second washing)

5.8. Colour reaction
Dispense 0.25 ml of substrate solution (see 1.8.) into each well and incubate (in the dark!) the covered plate 45 minutes at 4°C (agitating).

5.9. Stop reaction
Dispense 0.05 ml of stop reagent (1.9)
(blue colour turns into yellow).

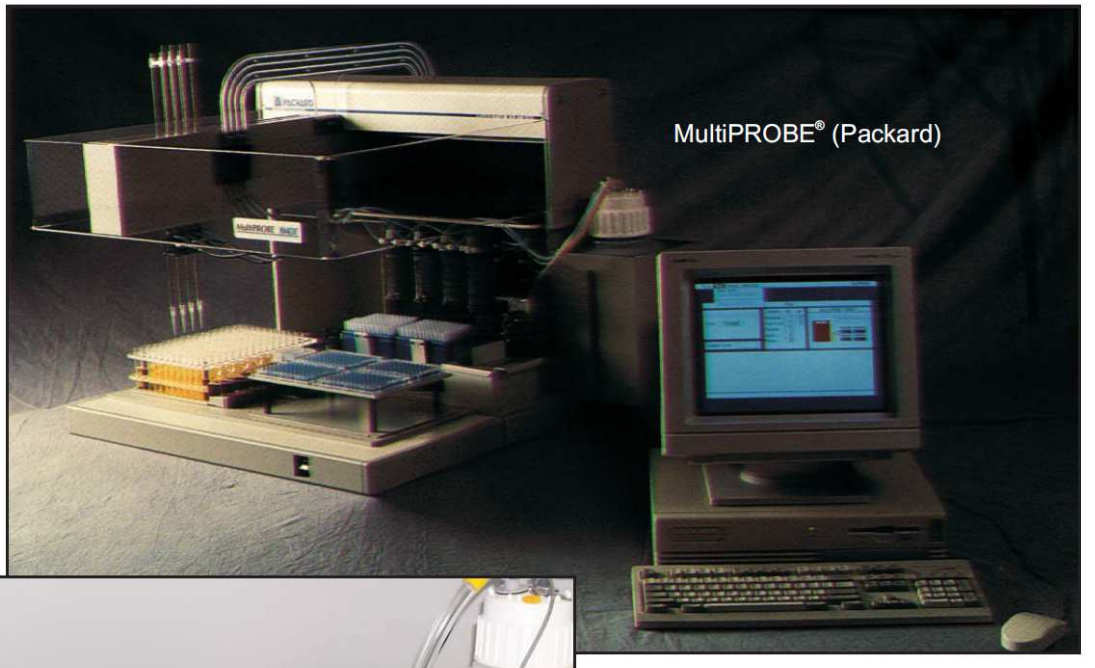
6. Absorbance measuring and calculations

Use an (automatic) MTP reader (in connection with a PC, equipped with a special software for calculation).
Reference filter: 620 nm
Measuring filter: 450 nm



7. Large scale analysis - special offer!

Large scale sampling is often necessary, especially in studies evaluating adrenocortical activity in animals by measuring faecal glucocorticoid metabolites. We have adapted our lab facilities in order to be able to handle large numbers of samples. So, if it is impossible or unpractical for you to analyse many samples, feel free to contact us (we will analyse them at a reasonable price; especially in case of a collaboration).



Automatic platewasher
(ELx405; BIO-TEK instruments)

Liquidator[96] (Steinbrenner)

8. How to validate an EIA for a given species (see also: Möstl & Palme, 2002; Palme, 2005; Möstl et al., 2005; Palme et al., 2005; Touma & Palme, 2005)

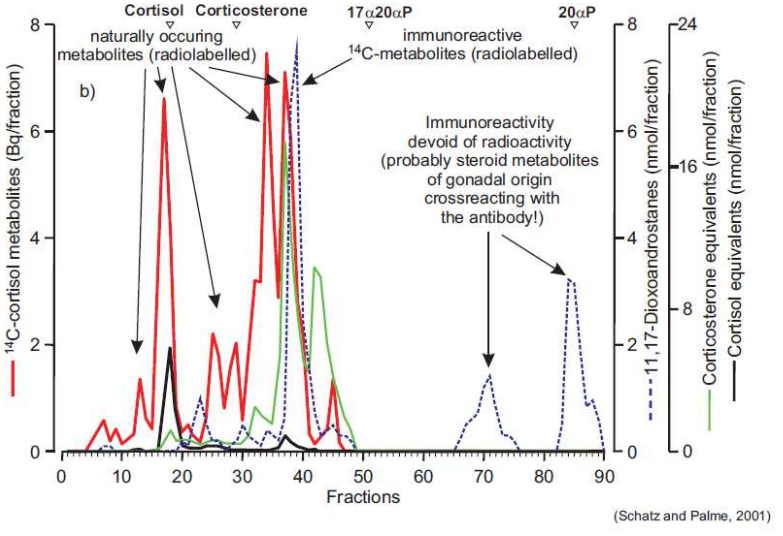
Before planning the experiment, please keep in mind that there is a species-specific delay time between the increase of glucocorticoids in blood and the excretion of the related metabolites in the faeces.

Before application in a new species, a careful analytical and, most important, physiolgical/biological validation of an EIA is mandatory.

8.1. Analytical validation of an EIA

This includes certain criteria like accuracy, specificity (especially cross-reactions with reduced metabolites), sensitivity, precision, and parallelism of the dose response relationship for the standard and the unknown. It is particularly important to demonstrate that the antibody crossreacts with metabolites derived from the GC that are present in the blood. The best method for this is a radiometabolism study (not always possible): After infusion of radiolabelled cortisol (or corticosterone) and the extraction of the faecal sample, a high performance liquid chromatography (HPLC) is performed, and the eluent fractionised and all HPLC-fractions are collected. After measuring the radioactivity and immunoreactivity in the individual fractions, you can see if immunoreactive metabolites coelute with radioactive ones. (They should do so, otherwise the immunoreactive substance does not derive from the radioactive precursor.) One can also partly characterise the metabolites measured by comparing their chromatographic pattern with standards (if available). One can at least compare the immunoreactive substance(s) with the elution position of cortisol or corticosterone.

HPLC-Immunogram of faecal ^{14}C-cortisol metabolites of a male dog



(Schatz and Palme, 2001)

8.2. Physiological/biological validation

Physiological validation means that an increase/decrease in the glucocorticoid production causes an increase/decrease in the substance(s) measured in faecal samples, irrespective of the substance(s) measured. This can be done by injection of ACTH and/or dexamethasone. Additionally, the results of a "stress experiment" (e.g., transportation) may increase the plausibility that an assay measures glucocorticoid metabolites in faecal samples. In most species, lots of different metabolites are formed and excreted. If you have the possibility, you can test which EIA best reflects disturbances.

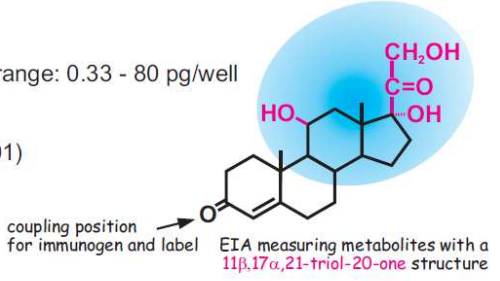
8.3. Other circumstances which may be important

As bacteria metabolise steroids in the faeces, you should check if this metabolism influences your experiment by storing fresh samples for a given time, mimicking the time between defaecation and sample collection in your experiment.
A frequently asked question (by reviewers) is the diurnal rhythm of the excretion. So it may be useful to conduct an experiment to answer this question (see Touma & Palme, 2005).

9. EIAs, produced by our working group, to measure glucocorticoids (or their metabolites) see also references (Info-letter.doc)

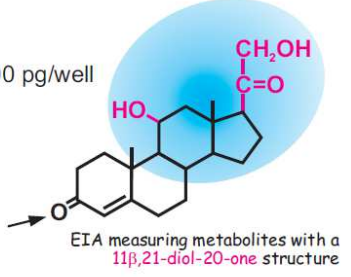
9.1. Cortisol (EIA first described: Palme and Möstl, 1997)

Standard: cortisol (4-pregnene-11β,17α,21-triol-3,20-dione); range: 0.33 - 80 pg/well
Antibody: cortisol-3-CMO:BSA (1:20,000)
Label: cortisol-3-CMO-DADOO-biotin (1:100,000)
Application: dogs (Schatz and Palme, 2001; Palme et al., 2001)



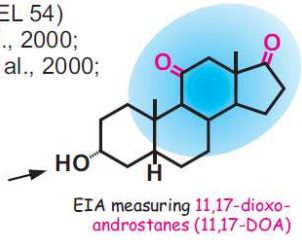
9.2. Corticosterone (EIA first described: Palme and Möstl, 1997)

Standard: corticosterone (4-pregnene-11β,21-diol-3,20-dione); range: 2 - 500 pg/well
Antibody: corticosterone-3-CMO:BSA (1:40000)
Label: cortisol-3-CMO-DADOO-biotin (1:200000)



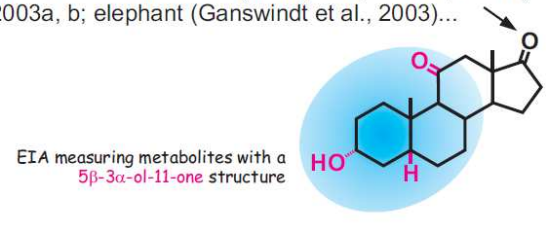
9.3. 11-oxoaetiocholanolone (Lab-code: 72-alt; EIA first described: Palme and Möstl, 1997)

Standard: 11-oxoaetiocholanolone (5β-androstane-3α-ol-11,17-dione); range: 2 - 500 pg/well
Antibody: 11-oxoaetiocholanolone-3-HS:BSA (1:20000; Ak 7/42/95)
Label: 11-oxoaetiocholanolone-3-glucosiduronate-DADOO-biotin (1:250000; EL 54)
Application: cattle and sheep: Palme et al., 1999, 2000; roe deer: Dehnhard et al., 2000; hare: Teskey-Gerstl et al., 2000; elephant: Stead et al., 2000; primates: Bahr et al., 2000; Wallner et al., 1999a, b; horse: Möstl et al., 1999; Merl et al., 2000;



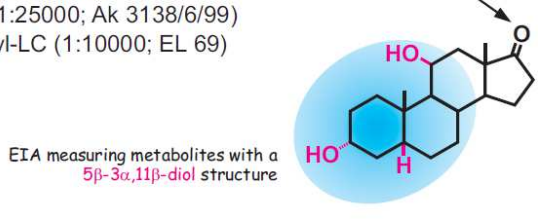
9.4. 11-oxoaetiocholanolone (Lab-code: 72T; EIA first described: Möstl et al., 2002)

Standard: 11-oxoaetiocholanolone (5β-androstane-3α-ol-11,17-dione); range: 2 - 500 pg/well
Antibody: 11-oxoaetiocholanolone-17-CMO:BSA (1:60000; Ak 3199/6/96)
Label: 11-oxoaetiocholanolone-17-CMO-biotinyl-3,6,9-trioxaundecanediamin (biotinyl-LC; 1:2x10^{6}; EL 71)
Application: cattle: Möstl et al., 2002; deer: Huber et al., 2003a, b; elephant (Ganswindt et al., 2003)...



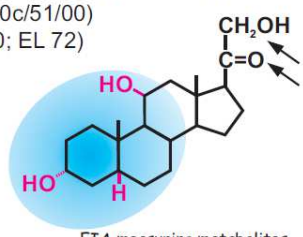
9.5. 11-β-hydroxyaetiocholanolone (Lab-code: 69a; EIA first described: Frigerio et al., 2004)

Standard: 5β-androstane-3α,11β-diol-17-one; range: 2 - 500 pg/well
Antibody: 5β-androstane-3α,11β-di-ol-17-one-CMO:BSA (1:25000; Ak 3138/6/99)
Label: 5β-androstane-3α,11β-di-ol-17-one-CMO-biotinyl-LC (1:10000; EL 69)



9.6. Lab-code: 50c (EIA first described: Quillfeldt et al., 2003)

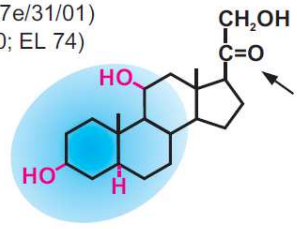
Standard: Tetrahydrocorticosterone (5ß-pregnane-3α,11ß,21-triol-20-one); range: 0.8 - 200 pg/well
Antibody: 5ß-pregnane-3α,11ß,21-triol-20-one-CMO:BSA (1:40000; Ak 50c/51/00)
Label: 5ß-pregnane-3α,11ß,21-triol-20-one-21-HS-biotinyl-LC (1:8000; EL 72)
Application: bird species



EIA measuring metabolites with a 5β-3α,11β-diol structure

9.7. Lab-code: 37e (EIA first described: Touma et al., 2003)

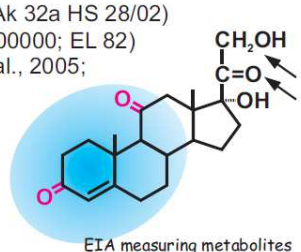
Standard: 5α-pregnane-3ß,11ß,21-triol-20-one; range: 0.8 - 200 pg/well
Antibody: 5α-pregnane-3ß,11ß,21-triol-20-one-CMO:BSA (1:30000; Ak 37e/31/01)
Label: 5α-pregnane-3ß,11ß,21-triol-20-one-CMO-biotinyl-LC (1:30000; EL 74)
Application: mice: Touma et al., 2003, rabbits: Monclus et al., 2006;
rats: Lepschy et al., 2007



EIA measuring metabolites with a 5α-3β,11β-diol structure

9.8. Cortisone (Lab-code: 32a; EIA first described: Rettenbacher et al., 2004)

Standard: 4-pregnene-17α,21-diol-3,11,20-trione; range: 2 - 500 pg/well
Antibody: 4-pregnene-17α,21-diol-3,11,20-trione-21-HS:BSA (1:20000; Ak 32a HS 28/02)
Label: 4-pregnene-17α,21-diol-3,11,20-trione-CMO-biotinyl-LC (1:5000000; EL 82)
Application: chicken: Rettenbacher et al., 2004; Black Grouse: Baltic et al., 2005;
Capercaillies: Thiel et al., 2005)



EIA measuring metabolites with a 3,11-dioxo structure

10. How to calculate the dilution factor

volume of the aqueous organic solvent for the extraction (µl) plus faecal weight (mg) (we add up both as it is a suspension)

e.g. 10, if the extracts were diluted 1:10

from the EIA-reader

$$\text{ng (steroid) per g (faeces)} = \frac{\text{pg (per well)} \times \text{extract volume} \times \text{dilution factor}}{\text{faecal weight} \times \text{sample volume} \times 1000}$$

expressed in g

volume transfered into the EIA (in µl)

to have the results expressed in ng instead of pg!