

# Comparação de método para análise de metabólitos fecais de glicocorticóides em jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) submetidas a tratamento hormonal e vídeo-laparoscopia

Regina Celia Rodrigues da PAZ<sup>1</sup>

Cláudio Alvarenga de

OLIVEIRA<sup>2</sup>

Marcílio NICHI<sup>2</sup>

Cristina Harumi ADANIA<sup>3</sup>

Eduardo Antunes DIAS<sup>2</sup>

Valquíria Hippólito

BARNABE<sup>2</sup>

Renato Campanarut

BARNABE<sup>2</sup>

1 - Departamento de Produção Animal da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá-MT

2 - Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP

3 - Associação Mata Ciliar, Jundiá-SP

## Resumo

Dois métodos de extração de metabólitos fecais<sup>32,33</sup> e dois conjuntos comerciais (“ImmuChem Doubly Antibody Corticosterone <sup>125</sup>I RIA” - ICN Biomedicals e “Coat-a-count Cortisol <sup>125</sup>I RIE” - DPC) foram utilizados na mensuração dos metabólitos de glicocorticóides (cortisol e corticosterona) em amostras de fezes de jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) (n=3), antes e após tratamento hormonal e procedimentos de vídeo-laparoscopia. O objetivo desse estudo foi comparar e validar fisiologicamente os diferentes protocolos de extração e diferentes conjuntos comerciais na mensuração hormonal. Não houve diferença significativa com relação ao método de extração dos metabólitos. O conjunto comercial ICN Biomedicals provou ser melhor na detecção de metabólitos fecais de glicocorticóides em jaguatiricas.

## Palavras-chave:

Monitoramento não invasivo.

Glicocorticóides.

Felinos.

Esteróides fecais.

Felídeos.

## Correspondência para:

Regina Celia Rodrigues da Paz  
Avenida Fernando Correa da Costa, s/n –  
Coxipó – Cuiabá - MT – CEP 78060-000,  
Fone: (65) 36158681, Fax: (65) 36158614,  
e-mail: repaz@usp.br  
reginacrpaz@gmail.com

Recebido para publicação: 03/04/2006

Aprovado para publicação: 23/08/2007

## Introdução

Todas as espécies pertencentes ao gênero *Leopardus* constam da Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção, gerada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA)<sup>1</sup>, na categoria de ameaça vulnerável, bem como, do Apêndice I do “Conservation International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna – CITES”<sup>2</sup>. Dentre estes felídeos está a jaguatirica (*Leopardus pardalis*), um felídeo não doméstico de porte médio, hábito solitário e atividade predominantemente noturna.<sup>3</sup>

Visando minimizar esse quadro, a Organização Mundial de Zoológicos (IUDZG) e o Grupo de Especialistas em Reprodução em Cativo (CBSG) da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) indicaram a utilização de métodos de reprodução assistida como

inseminação artificial, fertilização *in vitro* e injeção intracitoplasmática como técnicas de apoio à conservação dessas espécies.<sup>4</sup>

No entanto, para a aplicação destas técnicas há a necessidade de ovulação induzida e laparoscopia, procedimentos considerados altamente estressantes a animais selvagens, que tem como consequência a redução nas taxas de sucesso reprodutivo.

A técnica de aspiração folicular por via laparoscópica deve ser precedida por tratamentos hormonais para indução da atividade ovariana.<sup>5</sup> O uso da combinação Gonadotropina Coriônica equina (eCG) e Gonadotropina Coriônica humana (hCG) tem sido utilizada com sucesso em tigre (*Panthera tigris*)<sup>6</sup>, guepardo (*Acinonyx jubatus*)<sup>7</sup>, leopardo nebuloso (*Neofelis nebulosa*)<sup>8</sup>, puma (*Puma concolor*)<sup>9</sup> e jaguatirica (*Leopardus pardalis*)<sup>10</sup>; enquanto que a combinação Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e Hormônio Luteinizante (LH) tem sido

utilizada com sucesso em leopardo do deserto indiano (*Felis sylvestris ornata*)<sup>11</sup>, tigre<sup>12,13</sup> e onça pintada (*Panthera onca*)<sup>14</sup>.

Estudos com felinos selvagens tem preconizado o uso da associação eCG/hCG, principalmente para evitar o estresse associado às múltiplas injeções de FSH.<sup>15</sup> No entanto, a utilização de FSH/LH suíno determinou um maior número de oócitos comparado ao protocolo estabelecido de eCG/hCG em tigres (*Panthera tigris*), demonstrando que o possível estresse originado das aplicações diárias não influenciaram a resposta ovariana<sup>12</sup>. Segundo os autores, para eventos de fecundação *in vitro*, a combinação FSH/LH suíno deve ser utilizada, em detrimento da combinação eCG/hCG, uma vez que proporciona uma melhor resposta ovariana.

Entretanto, um protocolo de reprodução assistida que dá bons resultados para uma espécie pode não funcionar para outra, mesmo entre espécies da mesma família e gênero, em decorrência das especificidades fisiológicas naturais.<sup>16</sup>

Vários fatores podem influenciar a resposta ovariana aos tratamentos hormonais, quais sejam: momento da injeção em relação ao momento do ciclo, dose hormonal, idade, estado nutricional e estação do ano.<sup>17</sup>

Outro fator importante que influencia a fertilização e subsequente desenvolvimento embrionário é a dose de gonadotrofina exógena utilizada para estimulação da atividade ovariana.<sup>18</sup> Espécies de tamanho e peso semelhantes podem requerer doses variáveis, possivelmente por algumas serem menos sensíveis às gonadotrofinas exógenas.<sup>10,15</sup>

Outro aspecto importante refere-se ao dia do estro, já que em gatos domésticos a indução da ovulação por LH exógeno no primeiro dia do estro resulta em falha do folículo em responder ao estímulo.<sup>18</sup> Este problema pode ser contornado pelo uso associado de eCG ou FSH e hCG ou LH, aumentando, ainda, o número de oócitos recuperados sem comprometimento da fertilização ou qualidade do embrião.<sup>18</sup>

O intervalo entre a dose de LH ou hCG e a recuperação do oócito pode determinar o estado de maturação deste. De forma geral, os oócitos pré-ovulatórios são colhidos 24-26 horas após o tratamento com LH ou hCG.<sup>5,19</sup>

É crescente o interesse no desenvolvimento de métodos que possam acessar o estresse em animais mantidos em zoológico, para se determinar como as condições de cativeiro podem afetar a saúde e a reprodução destes animais.

A mensuração de metabólitos de glicocorticóides (cortisol e corticosterona) nas fezes é uma técnica não invasiva de monitoramento da fisiologia animal que pode refletir uma resposta adrenal a agentes potencialmente estressores.<sup>20,21</sup> Estudos sobre o metabolismo hormonal da Família *Felidae* demonstraram que a maioria dos metabólitos de hormônios esteróides de origem gonadal e adrenal são excretados nas fezes.<sup>21,22,23,24,25,26</sup>

Procedimentos anestésicos determinaram elevação transitória nos níveis de corticóides fecais, assim como, procedimentos de translocação e introdução de novos machos ao recinto determinaram aumento nos níveis de corticóides fecais em guepardos (*Acynonix jubatus*).<sup>23</sup>

Em estudo realizado no Brasil com pequenos felinos neotropicais, gatos-domato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) e gatos maracaja (*Leopardus wiedii*), exibiram distintas elevações nas concentrações de corticóides fecais, após a transferência de recintos grandes e enriquecidos ambientalmente para recintos pequenos e sem enriquecimento ambiental. No entanto, redução nas concentrações de corticóides fecais após mudança de recinto e enriquecimento ambiental ocorreu apenas em gato-domato-pequeno, indicando haver diferenças entre espécies da mesma família e gênero.<sup>27</sup>

A mensuração dos metabólitos do cortisol em fezes como indicador de estresse, foi realizada anteriormente utilizando-se conjuntos comerciais duplo anticorpo para corticosterona ICN Biomedicals – radioimunoensaio<sup>23,24</sup>, bem como, em soro

sanguíneo utilizando-se o conjunto comercial fase sólida DPC – radioimunoensaio.<sup>22,23,24</sup> Vários experimentos indicaram o conjunto comercial <sup>125</sup>I Corticosterona duplo anticorpo ICN Biomedicals – radioimunoensaio para a detecção de metabólitos fecais de glicocorticóides de diferentes espécies não domésticas, por este possuir uma taxa de reação cruzada bastante alta com diferentes metabólitos.<sup>20,21,22,23,28,29,30,31</sup>

Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi comparar dois métodos de extração de metabólitos fecais descritos por Shwarzemberger et al.<sup>32</sup> e Wasser et al.<sup>33</sup>; e dois conjuntos comerciais [“ImmuChem Double Antibody Corticosterona <sup>125</sup>I RIE” - ICN Biomedicals e “Coat-a-count Cortisol <sup>125</sup>I RIE” – DPC] na mensuração dos metabólitos de glicocorticóides por radioimunoensaio em fezes de jaguatiricas estimuladas hormonalmente.

## Material e Método

Foram utilizados três animais (Studbook número: 240, 254 e 285), com idade entre 4 e 12 anos, do Centro Brasileiro de Felinos Neotropicais sediado na Associação Mata Ciliar (AMC), Jundiá/São Paulo/Brasil -Latitude 23° 10' 56. 5 S./ Longitude 46° 53' 29" 9 O.

Durante o período experimental (agosto/2001) os animais foram alimentados com ratos previamente eutanasiados (3-4 vezes/semana) e pescoço de frango (3 vezes/semana), suplementados periodicamente com premix vitamínico e mineral (Aminomix Pet; Vetnil, SP, Brasil).

Os animais foram mantidos em recintos (7m x 3m x 2,5m) cobertos parcialmente por laje, fechados frontalmente com tela, contendo piso de cimento e área externa com boa insolação, troncos, vegetação rasteira e arbustos. O cambiamento era de cimento, contendo em seu interior recipiente para água e uma caixa de madeira com gramínea.

Cada recinto continha um casal de jaguatiricas, sendo que durante o período experimental a fêmea foi mantida

temporariamente no cambiamento, visando desta maneira, facilitar a colheita das amostras de fezes e a administração dos hormônios.

Na fêmea número 240 foi administrado protocolo contendo 225UI hCG / IM (Gonadotropina Coriônica humana - Vetecor, Carlier, Barcelona, Espanha), 80 horas após a administração de 500 UI eCG / IM (Gonadotropina Coriônica equina - Novormon, Syntex, Argentina), sendo a aspiração folicular por vídeo-laparoscopia realizada 24-28 horas após a administração do hCG<sup>10</sup>. Nas fêmeas número 254 e 285 foi administrado protocolo contendo 50UI pFSH / IM (Hormônio Foliculo Estimulante - Folltropin, Bioniche Animal Health, Belleville, Ontario, Canada), administrados gradativamente, em quatro dias consecutivos, com intervalos de 14 horas (20UI), 24 horas (15UI), 24 horas (10UI) e 18 horas (5UI), respectivamente. No dia cinco, 18 horas após a administração da última dose de pFSH, foi aplicada uma dose de 20UI de pLH / IM (Hormônio Luteinizante - Lutropin, Bioniche Animal Health), sendo a vídeo-laparoscopia realizada 24-28 horas após a administração do pLH.<sup>34,35,36</sup>

As fezes foram colhidas diariamente em sacos plásticos previamente identificados e armazenadas a -5°C até o momento das análises. As análises foram realizadas no Laboratório de Dosagens Hormonais do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (LDH-FMVZ-VRA-USP). Ressalta-se que os animais não defecaram diariamente, principalmente nos dias subseqüentes a vídeo-laparoscopia, em decorrência do jejum prévio necessário para realização dos procedimentos anestésicos.

A extração de metabólitos hormonais foi realizada utilizando-se as técnicas previamente descritas por Shwarzemberger et al.<sup>32</sup> e Wasser et al.<sup>33</sup>.

Para o método de extração descrito por Shwarzemberger et al.<sup>32</sup> 0,48 a 0,52 g de fezes úmidas foram pesadas; diluídas em 5 mL de metanol 80% e dissolvidas com

auxílio de bastão de vidro. Na seqüência as amostras foram agitadas por 30 segundos e homogeneizadas por 12 horas. Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas a 270 G por 15 minutos e o sobrenadante foi reservado em microtubos que foram congelados até a realização do ensaio.

Para o método de extração descrito por Wasser et al.<sup>33</sup> 0,2 g de fezes secas foram pesadas, diluídas em 5 mL de etanol 90% e fervidas durante 25 minutos, repondo-se sempre o etanol 90% para manter o volume inicial. Após esta etapa as amostras foram centrifugadas por 15 min a 500 G, o sobrenadante recuperado e o sedimento resultante ressuspensionado em 5 mL de etanol 90%, agitado e centrifugado novamente por 15 minutos a 500g. Os dois sobrenadantes foram combinados, secos completamente em fervura e dissolvidos em 1 ml de metanol. O extrato foi então homogeneizado por 1 minuto e levado para o banho ultrassônico por 15 minutos. As amostras foram finalmente diluídas para o ensaio em PBS Gelatina 0,1% .

A extração de metabólitos hormonais foi realizada utilizando-se as duas técnicas descritas em todas as amostras colhidas do animal 240 (n = 12). As amostras deste animal extraídas pela técnica descrita por Shwarzemberger et al.<sup>32</sup> foram mensuradas por meio da técnica de radioimunoensaio utilizando o conjunto comercial “ImmuChem Doubly Antibody Corticosterona <sup>125</sup>I RIE” - ICN Biomedicals e “Coat-a-count Cortisol <sup>125</sup>I RIE” - DPC. A mensuração dos metabólitos, extraídos das fezes deste animal pela técnica descrita por Wasser et al.<sup>33</sup>, foi realizada por meio da técnica de radioimunoensaio, utilizando apenas o conjunto comercial “Coat-a-count Cortisol <sup>125</sup>I RIE” - DPC.

A extração de metabólitos hormonais, nas amostras colhidas dos animais 254 (n = 17) e 285 (n = 8), foram realizadas segundo a técnica descrita por Shwarzemberger et al.<sup>32</sup>. A mensuração dos metabólitos nestas amostras foi realizada por meio da técnica do radioimunoensaio utilizando os conjuntos comerciais

“ImmuChem Doubly Antibody Corticosterona <sup>125</sup>I RIE” - ICN Biomedicals e “Coat-a-count Cortisol <sup>125</sup>I RIE” - DPC.

Para a validação dos ensaios realizou-se a curva de paralelismo, ou seja, foi utilizado um “pool” de amostras em diluições seriadas. Cada diluição foi mensurada no ensaio como uma amostra individual e posteriormente comparada com os valores da curva padrão para verificar o paralelismo.

Para comparação entre os dados mensurados pela técnica de radioimunoensaio os resultados para os metabólitos de glicocorticóides foram expressos em ng/g fezes. Para chegar-se a esses valores, o resultado da concentração do ensaio do conjunto comercial ICN Biomedicals (ng/ml) e DPC (mg/dl) foi multiplicado pelo valor do volume final da extração, pelo valor da diluição do ensaio, pelo fator 1,27 ou 1,21 (valor da recuperação subtraído de 1) e dividido pelo peso da amostra. O volume final segundo o protocolo de Schwarzemberger et al.<sup>32</sup> foi de 5 ml, com uma taxa de recuperação de 73%. O volume final segundo o protocolo de Wasser et al.<sup>33</sup> foi de 1 ml, com uma taxa de recuperação de 79%. Os valores da diluição para o ensaio do conjunto comercial DPC e ICN Biomedicals foram respectivamente 1:4 e 1:100.

Os dados foram analisados utilizando o programa “The SAS System for Windows V8” (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2000, nº serial GTA-31722-232), obedecendo a um Fatorial 2X2, tendo como fatores o Tempo (antes e após tratamento hormonal e vídeo-laparoscopia) e os Conjuntos Comerciais (ICN Biomedicals e DPC). Neste caso foi utilizado o conjunto das médias e erros padrões dos valores basais anteriores aos procedimentos e o conjunto das médias e erros padrões dos valores após os procedimentos (em até dois dias após os procedimentos). Os testes foram fixados em  $p < 0,05$  para a rejeição da hipótese de nulidade. As correlações e as regressões também foram calculadas pelo programa SAS.

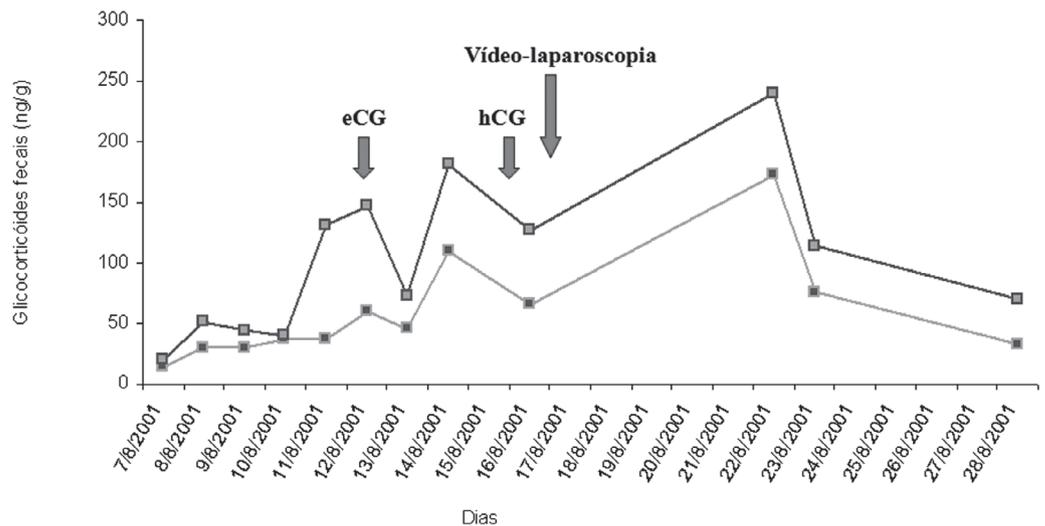
## Resultados

A média dos valores de glicocorticóides extraídos por meio da técnica de Schwarzenberger et al.<sup>32</sup> e mensurados pelo conjunto comercial DPC - radioimunoensaio para o animal 240 foi de 2,066 µg/dl, com uma recuperação de 73%. A média dos valores de glicocorticóides extraídos por meio da técnica de Wasser et al.<sup>33</sup> e mensurados pelo conjunto comercial DPC - radioimunoensaio para o animal 240 foi de 2,5215 µg/dl, com uma recuperação de 79%. A correlação entre as técnicas de extração foi de 0,90 ( $p < 0,0001$ ) e o coeficiente de regressão entre as extrações foi de 0,80 ( $p < 0,0001$ ) (Figura 1).

O coeficiente de variação baixo para o

Schwarzenberger et al.<sup>32</sup>, demonstrou diferença significativa ( $p = 0,007$ ) em relação à comparação entre os tempos, antes e depois dos procedimentos. Utilizando-se o conjunto comercial DPC não houve diferença significativa ( $p = 0,100$ ) com relação à comparação entre os tempos (Tabela 1, Figura 2).

Com relação ao efeito dos Conjuntos Comerciais (ICN Biochemicals e DPC), antes e após tratamento hormonal e vídeo-laparoscopia, utilizando a extração segundo a técnica modificada de Schwarzenberger et al.<sup>32</sup>, houve diferença significativa tanto antes ( $p = 0,009$ ) como após ( $p = 0,023$ ) os procedimentos, nas concentrações de glicocorticóides fecais das jaguatiricas (Tabela 2, Figura 2).



**Figura 1** - Perfil de glicocorticóides fecais do animal 240 ( $n = 12$ ), segundo as técnicas descritas por Wasser et al.<sup>33</sup> e Schwarzenberger et al.<sup>32</sup>, mensurado por RIE utilizando conjunto comercial DPC, São Paulo/SP, 2004

conjunto comercial ICN Biomedicals foi de 1,18%, e o coeficiente de variação alto foi de 8,53%. Para o conjunto comercial DPC o coeficiente de variação baixo foi de 2,81%, e o coeficiente de variação alto foi de 7,59%.

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

O efeito dos procedimentos, tratamento hormonal e vídeo-laparoscopia, nos níveis de glicocorticóides fecais das jaguatiricas, utilizando a extração segundo a técnica de

Todos os três animais responderam ao tratamento hormonal apresentando 3, 4 e 4 folículos > 2mm, respectivamente. Após a aspiração folicular, realizada pela técnica de vídeo-laparoscopia, foi possível a recuperação de oócitos em todos os animais. Os oócitos foram classificados ao estereomicroscópio em Grau I, II e III<sup>5</sup>. O animal 240 apresentou um oócito G I e um oócito G III; o animal 254 apresentou um oócito G I, dois oócitos G II e um oócito G III e o animal 285 apresentou um oócito G I, dois oócitos G II e um oócito G III.

**Tabela 1** - Efeito dos procedimentos, antes e após tratamento hormonal e vídeo-laparoscopia, nos níveis de glicocorticóides fecais das jaguatiricas, utilizando a extração segundo a técnica de Schwarzenberger et al.<sup>32</sup> nos dois conjuntos comerciais ICN Biochemicals e DPC, São Paulo/SP – 2004

Efeito	ICN			DPC		
	Antes	Após	p*	Antes	Após	p**
Glicocorticóides (ng/g fezes úmidas)	130.835,72 ±16.315,04	798.507,33 ±263.526,56	0,007	41.001,42 ±15.299,09	117.361,17 ±40.332,13	0,100

\* referente à comparação entre tempos pelo conjunto comercial ICN Biochemicals.

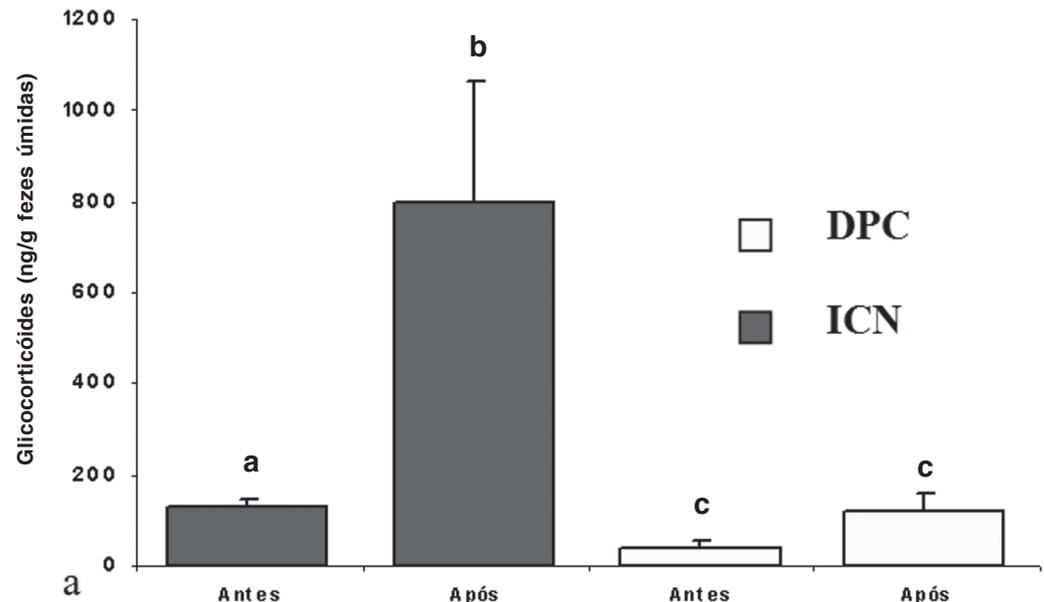
\*\* referente à comparação entre tempos pelo conjunto comercial DPC.

**Tabela 2** - Efeito dos Conjuntos Comerciais (ICN Biochemicals e DPC) antes e após os procedimentos, tratamento hormonal e vídeo-laparoscopia, nos níveis de glicocorticóides fecais das jaguatiricas, utilizando a extração segundo a técnica de Schwarzenberger et al.<sup>32</sup>, São Paulo/SP – 2004

Efeito	Antes		p*	Após		p**
	ICN	DPC		ICN	DPC	
Glicocorticóides (ng/g fezes úmidas)	130.835,72 ±16.315,04	41.001,42 ±15.299,09	0,009	798.507,33 ±263.526,56	117.361,17 ±40.332,13	0,023

\* referente à comparação entre conjuntos comerciais antes do procedimento.

\*\* referente à comparação entre conjuntos comerciais após o procedimento.



**Figura 2** - Efeito da interação entre os fatores Tempo (antes e após tratamento hormonal e vídeo-laparoscopia) e Conjunto Comercial (DPC e ICN) referente aos valores de glicocorticóides fecais das jaguatiricas 240 (n = 12), 254 (n = 17) e 285 (n = 8) extraídos segundo a técnica de Schwarzenberger et al.<sup>32</sup>, São Paulo/SP - 2004

## Discussão

Apesar da taxa de recuperação da técnica de extração de Wasser et al.<sup>33</sup> ter sido superior a de Schwarzenberger et al.<sup>32</sup> (79% e 73% respectivamente), houve correlação

entre as duas técnicas de extração (0,90;  $p < 0,0001$ ) (Figura 1). Estes dados corroboram com os dados obtidos por Wasser et al.<sup>20</sup> em que a média de metabólitos de cortisol extraídos por meio da técnica de Wasser et al.<sup>33</sup> foi de 9,0 ng/g ( $\approx 90-100\%$  de

recuperação). Neste mesmo artigo, a média de metabólitos de cortisol extraídos por meio da técnica de Schwarzenberger et al.<sup>32</sup> foi de 9,2 ng/g ( $\cong$  85-100% de recuperação).

No presente experimento, a média dos valores de glicocorticóides obtidos com a técnica de extração de Wasser et al.<sup>33</sup>, sem conversão para ng/g fezes úmidas foi de 2,521  $\mu$ g/dl, com uma recuperação de 79%; e com a técnica de Schwarzenberger et al.<sup>32</sup> esse valor foi de 2,066  $\mu$ g/dl, com uma recuperação de 73%. Essas informações comprovam que para a extração de metabólitos de glicocorticóides em fezes de jaguatiricas foi indiferente a escolha da técnica, pois os valores obtidos das duas técnicas se aproximaram. Porém é imprescindível lembrar que a técnica de Schwarzenberger et al.<sup>32</sup> é bem mais simples de ser executada, exigindo um menor número de etapas e de equipamentos.

No perfil dos metabólitos as concentrações aumentaram acentuadamente após a estimulação ovariana e a vídeo-laparoscopia na mensuração com o conjunto comercial ICN Biomedicals. No conjunto comercial DPC esse aumento não foi tão marcado (Figura 2, Tabelas 1 e 2). Essas informações corroboram com as de Wasser et al.<sup>20</sup> que demonstraram que a mensuração de glicocorticóides fecais utilizando o anticorpo para corticosterona ICN Biomedicals pode efetivamente detectar mudanças na atividade endógena da adrenal em várias espécies de mamíferos e aves, por possuir reação cruzada com múltiplos metabólitos destes glicocorticóides.

Möstle e Palme<sup>29</sup> afirmaram que o anticorpo corticosterona ICN Biomedicals trouxe melhores resultados na mensuração de glicocorticóides fecais, o que foi confirmado com as mensurações realizadas neste experimento, em situações claramente estressantes aos animais, indicando sua relevância biológica e, portanto, validando fisiologicamente o conjunto para mensuração de metabólitos de glicocorticóides em fezes de jaguatiricas.

A administração de ACTH (Hormônio Adrenocorticotrófico), ou

Desafio com ACTH, mimetiza uma resposta natural da adrenal ao estresse, causando um rápido aumento dos glicocorticóides (cortisol e corticosterona), seguido por um retorno destes para níveis basais em poucas horas.<sup>20</sup> Em gatas domésticas os níveis séricos de cortisol retornaram para valores basais em um período aproximado de 180 minutos, após a administração do ACTH.<sup>37</sup> Outros estudos em diferentes espécies de carnívoros também apontaram que a extração dos metabólitos de glicocorticóides nas fezes ocorre entre 24-72 horas após a administração do ACTH.<sup>21,22,24,28,38</sup>

Diferentemente dos estudos realizados com a administração de ACTH, as concentrações dos glicocorticóides fecais, após as estimulações hormonais e vídeo-laparoscopias, permaneceram altas por mais de um dia, indicando que este tipo de estímulo apresenta maior intensidade quando comparado ao estímulo provocado pelo desafio com ACTH.

No entanto, mesmo havendo aumento da concentração dos metabólitos de glicocorticóides por mais de um dia, após as estimulações hormonais e a vídeo-laparoscopia, evidenciando-se desta maneira uma situação clara de estresse, houve a recuperação de oócitos viáveis no ovário das três fêmeas.

Van Lier et al.<sup>39</sup> presumiram que a produção de progesterona tem uma alta dependência na produção do cortisol, visto que a própria progesterona é um dos esteróides precursores do cortisol e que este e seus precursores seriam liberados simultaneamente.<sup>40</sup>

Neste caso, outra hipótese seria a de que a intervenção teria causado um estresse agudo que não interferiu no mecanismo hormonal da ovulação. Como na maioria dos felídeos, a ovulação em jaguatiricas é induzida por um estímulo decorrente de uma situação aguda de estresse gerada na cópula. É possível presumir que o cortisol, produzido pela adrenal neste momento, desempenhe um importante papel no evento da liberação dos oócitos. Entretanto, em casos de estresse crônico, o cortisol

produzido pela adrenal provavelmente possui uma ação deletéria na reprodução, atuando negativamente na secreção pulsátil de LH.

A progesterona produzida pela adrenal de ratas teve grande influência no seu ciclo estral, já que foi secretada em altas concentrações.<sup>21</sup> Piva et al.<sup>41</sup> reforçaram esta idéia, concluindo que em ratas o aumento da liberação de progesterona pela adrenal no proestro pode facilitar a liberação de LH e desencadear o comportamento de cópula.

Seguindo esta mesma linha, Asher, Peterson e Duganzich<sup>42</sup> relataram que em situações de estresse extremo, cervos dama (*Dama dama*) produziram altas concentrações de progesterona oriunda da adrenal e que isto aparentemente inibiu a onda pré-ovulatória de LH no início do estro.

Estes autores fizeram outra interessante inferência, a de que a grande concentração de progesterona produzida pela adrenal pode ocasionalmente confundir a interpretação dos perfis de progesterona plasmática em algumas espécies de veados. Essa é uma importante informação que deveria ser considerada no estudo do ciclo estral por meio da mensuração de hormônios esteróides em animais sob condições adversas de cativeiro.

Outra participação da progesterona produzida pela adrenal, dentro de uma estratégia reprodutiva, ocorreu quando cervos-de-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*), em períodos de estresse, tiveram a prenhez mantida pela neutralização da ação abortiva

do cortisol pela própria progesterona, e inibição da fase estral e da ovulação durante a época reprodutiva para prevenir a prenhez em condições extremas de estresse.<sup>43</sup>

## Conclusões

Para a extração de metabólitos de glicocorticóides fecais de jaguatiricas as técnicas descritas por Wasser et al.<sup>33</sup> e Schwarzenberger et al.<sup>32</sup> foram eficientes.

O conjunto comercial “ImmuChem Doubly Antibody Corticosterone <sup>125</sup>I RIE” - ICN Biomedicals teve um desempenho superior na mensuração dos metabólitos de glicocorticóides das fezes de jaguatiricas quando comparado ao conjunto comercial “Coat-a-count Cortisol <sup>125</sup>I RIE” - DPC, validado fisiologicamente.

Houve aumento na concentração de metabólitos fecais de glicocorticóides em jaguatiricas após os procedimentos, tratamento hormonal e video-laparoscopia, indicando a situação de estresse a que essas fêmeas foram submetidas. Porém sem significância reprodutiva, uma vez que oócitos viáveis foram recuperados do ovário das três fêmeas.

## Agradecimentos

À Érica C.G. Felipe do Laboratório de Dosagens Hormonais da USP pelo apoio técnico.

Ao apoio financeiro da FAPESP.

## Comparison of methods fecal glucocorticoids metabolite analyses in ocelots (*Leopardus pardalis*) submitted to hormonal treatment and video-laparoscopy

### Abstract

The objective of this study was to compare two different fecal metabolites extraction protocols<sup>32,33</sup> and two commercial kits used to analyse fecal glucocorticoids (cortisol and corticosterone) in ocelots (*Leopardus pardalis*) submitted to hormonal treatment and video-laparoscopy procedure. Based on hormonal analyses, both extraction protocols exhibited similar performance. One commercial kit (ICN Biomedicals) had better results than another (DPC) on glucocorticoids metabolites evaluation.

### Key words:

Non-invasive monitoring.  
Glucocorticoids.  
Felids.  
Fecal steroids.  
Feline.

## Referências

- 1 MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). **Lista nacional das espécies da fauna brasileira ameaçadas de extinção**. Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/sbf/fauna>. Acesso em: 10 mar. 2006.
- 2 APÊNDICE I. In: **Conservation International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna** (CITES). Disponível em: <http://www.cites.org>. Acesso em: 10 mar. 2006.
- 3 OLIVEIRA, T. G.; CASSARO, K. **Guia de identificação de felinos brasileiros**. 2. ed. São Paulo: Sociedade de Zoológicos do Brasil, 1999. p. 17-19.
- 4 INTERNATIONAL UNION ZOOLOGICAL AND BOTANICAL GARDEN/INTERNATIONAL SPECIALIST GROUP FOR NATURE CONSERVATION (IUDZG/CBSG). **The world zoo conservation strategy: the role of the zoos and aquaria of the world in global conservation**. Chicago: Zoological Society, 1993. 76 p.
- 5 GOODROWE, K. L. et al. Developmental competence of domestic cat follicular oocytes after *in vitro* fertilization. **Biology of Reproduction**, v. 39, p. 355-372, 1988.
- 6 DONOGHUE, A. M. et al. In vitro fertilization and embryo development in vitro and in vivo in the tiger (*Panthera tigris*). **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 33-44, 1990.
- 7 HOWARD, J. G. et al. Successful induction of ovarian activity and laparoscopic intrauterine artificial insemination in the cheetah (*Acinonyx jubatus*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 23, n. 4, p. 288-300, 1992.
- 8 HOWARD, J. G. et al. Successful ovulation induction and laparoscopic intrauterine artificial insemination in the clouded leopard (*Neofelis nebulosa*). **Zoo Biology**, v. 15, p. 55-70, 1996.
- 9 BARONE, M. A.; WILDT, C. E.; BYERS, A. P. Gonadotropin dose and timing of anesthesia for laparoscopic artificial insemination in the puma (*Felis concolor*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 101, p. 103-108, 1994.
- 10 SWANSON, W. F. et al. Responsiveness of ovaries to exogenous gonadotrophins and laparoscopic artificial insemination with frozen-thawed spermatozoa in ocelots (*Felis pardalis*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 106, p. 87-94, 1996.
- 11 POPE, C. E. et al. Successful interspecies transfer of embryos from the indian desert cat (*Felis silvestris*) to the domestic cat (*Felis catus*) following in vitro fertilization. **Biology of Reproduction**, v. 40, p. 61, 1989. Supplement 1. Abstract 40.
- 12 CRICHTON, E. C. et al. The efficacy of porcine gonadotrophins for repeated stimulation of ovarian activity for in vitro embryo production in Siberian tigers (*Panthera tigris altaica*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 25, p. 257, 2000. Abstract.
- 13 CRICHTON, E. G. et al. Development competence in vitro of embryos produce from siberian tigers (*Panthera tigris altaica*) cryopreserved by controlled rate freezing versus vitrification. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 328, 2000a.
- 14 MORATO, R. G. et al. Ovarian stimulation and successful in vitro fertilization in the jaguar (*Panthera onca*). **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 334, 2000.
- 15 ROTH, T. L. et al. Effects of equine chorionic gonadotropin, human chorionic gonadotropin, and laparoscopic artificial insemination on embryo, endocrine, and luteal characteristics in the domestic cat. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 165-171, 1997.
- 16 WILDT, D. E. et al. Embryogenesis in conservation biology or how to make an endangered species embryo. **Theriogenology**, v. 37, n. 1, p. 161-184, 1992.
- 17 HODGES, J. K. Determining and manipulating female reproductive parameters. In: KLEIMAN, D. G.; ALLEN, M. E.; THOMPSON, K. V.; LUMPKIN, S. **Wild mammals in captivity: principles and techniques**. Chicago: University of Chicago Press, 1996. p.418-428.
- 18 DONOGHUE, A. M. et al. Birth of a siberian tiger cub (*Panthera Tigris altaica*) following laparoscopic intrauterine artificial insemination. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 24, n. 2, p. 185-189, 1993.
- 19 POPE, C. E. et al. In vitro fertilization in domestic and nondomestic cats including sequences of early nuclear events, in vitro development, cryopreservation and successful intra and interspecies embryo transfer. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 47, p. 189-201, 1993. Supplement.
- 20 WASSER, S. K. et al. A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. **General and Comparative Endocrinology**, v. 120, p. 260-275, 2000.
- 21 WIELEBNOWSKI, N. C. et al. Noninvasive assessment of adrenal activity associated with husbandry and behavioral factors in North American clouded leopard population. **Zoo Biology**, v. 21, p. 77-98, 2002.
- 22 GRAHAM, L. H.; BROWN, J. L. Cortisol metabolism in the domestic cat and implications for noninvasive monitoring of adrenocortical function in endangered felids. **Zoo Biology**, v. 15, p. 71-82, 1996.
- 23 TERIO, K. A.; CITINO, S. B.; BROWN, J. L. Fecal cortisol metabolite analysis for noninvasive monitoring of adrenocortical function in the cheetah (*Acinonyx jubatus*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 30, n. 4, p. 484-491, 1999.
- 24 SCHATZ, S.; PALME, R. Measurement of faecal

- cortisol metabolites in cats and dogs: a non-invasive method for evaluation adrenocortical function. **Veterinary Research Communications**, v. 25, p. 271-287, 2001.
- 25 SHILLE, V. M. et al. Metabolites of estradiol in serum, bile, intestine and feces of the domestic cat (*Felis catus*). **Theriogenology**, v. 34, p. 779-794, 1990.
- 26 BROW, J. L. et al. Comparative aspects of steroids hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured non-invasive in feces. **Biology of Reproduction**, v.51, p. 776-786, 1994.
- 27 MOREIRA, N. **Reprodução e estresse em fêmeas de felídeos do gênero *Leopardus***. 2001. 231 f. Tese (Doutorado em Zoologia) – Curso de Pós-graduação em Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.
- 28 MONFORT, S. L. et al. Evaluating adrenal activity in african wild dogs (*Lycaon pictus*) by fecal corticosteroids analysis. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 29, n. 2, p. 129-133, 1998.
- 29 MÖSTL, E.; PALME, R. Hormones as indicators of stress. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p. 67-74, 2002.
- 30 LYNCH, J. W. et al. Concentrations of four fecal steroid in wild baboons: short-term storage conditions and consequences for data interpretation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 132, p. 264-271, 2003.
- 31 HUNT, K. E.; TRITES, A. W.; WASSER, S. K. Validation of a fecal glucocorticoid assay for Steller sea lions (*Eumetopias jubatus*). **Physiology & Behavior**, v. 80, p. 595-601, 2004.
- 32 SCHWARZEMBERGER, F. et al. Concentration of progestagens and oestrogens in the faeces of pregnant Lipizzan, Trotter and Thoroughbred mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 44, p. 489-499, 1991. Supplement.
- 33 WASSER, S. K. et al. Excretion rates and metabolites of oestradiol and progesterone in baboon (*Papio cynocephalus cynocephalus*) faeces. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 101, p. 213-220, 1994.
- 34 PAZ, R. C. R. **Bioteecnologias da reprodução utilizadas como ferramentas auxiliares no manejo e conservação de duas espécies de felinos selvagens: *Leopardus pardalis* e *Leopardus tigrinus***. 2004. 167 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- 35 PAZ, R. C. R. et al. Ovarian response to repeated administration of alternating exogenous gonadotropin regimens in the ocelots (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrinus*). **Theriogenology**, v. 66, p. 1787-1789, 2006.
- 36 PAZ, R. C. R. et al. Ovarian and immunological responses to alternating exogenous gonadotropin regimens in the ocelots (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrinus*). **Zoo Biology**, v. 24, p. 247-260, 2005.
- 37 CHATDARONG, K. et al. Exogenous ACTH induced progesterone levels in female domestic cats. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CANINE AND FELINE REPRODUCTION, "BASIC AND APPLIED RESEARCH ON DOMESTIC, EXOTIC AND ENDANGERED CARNIVORES", 5., 2004, São Paulo. **Abstract...** p. 182-185.
- 38 GOYMANN, W. et al. Noninvasive fecal monitoring of glucocorticoids in spotted hyenas, *Crocuta crocuta*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 114, p. 340-348, 1999.
- 39 VAN LIER, E. et al. Effects of administration of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) on extragonadal progesterone levels in sheep. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 33, p. 55-59, 1998.
- 40 FAJER, A. B.; HOLZBAUER, M.; NEWPORT, H. M. The contribution of the adrenal gland to the total amount of progesterone produced in the female rat. **Journal of Physiology**, v. 214, p. 115-126, 1971.
- 41 PIVA, F. et al. Adrenal progesterone: factors controlling its secretion. **Endocrinology**, v. 93, p. 1178-1184, 1973.
- 42 ASHER, G. W.; PETERSON, A. J.; DUGANZICH, D. Adrenal and ovarian sources of progesterone secretion in young female fallow deer, *Dama dama*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 85, p. 667-675, 1989.
- 43 PLOTKA, E. D. et al. The adrenal gland in white-tailed deer: a significant source of progesterone. **Journal of Wildlife Management**. v. 47, p. 38-44, 1983.