

Validação laboratorial e fisiológica de conjunto comercial para a quantificação de corticóides fecais em chimpanzé (*Pan troglodytes*) e orangotango (*Pongo pygmaeus*), cativos e submetidos a enriquecimentos ambientais

Cristiane Schilbach
PIZZUTTO¹
Manuela Gonçalves Fraga
Geronymo SGAI¹
Priscila VIAU¹
Marie Odile Monier
CHELINI¹
Cláudio Alvarenga de
OLIVEIRA¹
Marcelo Alcindo de Barros
Vaz GUIMARÃES¹

¹ Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP

Resumo

Neste trabalho foi realizado estudo comparativo dos níveis de corticóides fecais (CF) de chimpanzé (*Pan troglodytes*) e orangotango (*Pongo pygmaeus*). Foram analisadas amostras coletadas em duas fases distintas, relacionadas com a introdução de técnicas de enriquecimento ambiental, a saber: Base (antes da introdução) e Habituação (imediatamente após). Realizamos as validações do conjunto comercial para radioimunoensaio ImmunuChem™ Double Antibody Corticosterone da MP Biomedicals, para mensuração de CF. A validação laboratorial dos conjuntos diagnósticos para uso em extrato fecal de primatas foi realizada pelo método de paralelismo, no qual, para cada espécie, concentrações conhecidas de corticosterona foram adicionadas a um pool de extratos fecais, sendo estas amostras analisadas em seguida. As inclinações das curvas obtidas nestes ensaios e da curva padrão do ensaio foram então comparadas. Os resultados obtidos para chimpanzé e orangotango, foram respectivamente, $Y = 17,23 + 1,31 * X; R^2 = 0,98$ e $Y = 11,14 + 1,29 * X; R^2 = 0,99$. Para a validação fisiológica, foi utilizada a introdução de técnicas de enriquecimento ambiental como causador de aumento dos níveis de CF, conseqüentes à indução de resposta do tipo estresse. Os resultados foram expressos em médias e erros-padrão da média. As concentrações médias destes corticóides foram: chimpanzés: Base ($5,90 \pm 2,41 \times 10^3$ ng/g de fezes), Habituação ($14,92 \pm 4,66 \times 10^3$ ng/g de fezes) e para o orangotango: Base ($91,1 \pm 30,0 \times 10^3$ ng/g de fezes), Habituação ($185,1 \pm 57 \times 10^3$ ng/g de fezes). Houve diferença significativa ($P < 0,05$) para os valores destes CF para ambas as espécies entre as duas fases estudadas.

Palavras-chave:

Validação laboratorial.
Validação fisiológica.
Corticóides fecais.
Chimpanzé (*Pan troglodytes*).
Orangotango (*Pongo pygmaeus*).

Correspondência para:

Rua Caraibas, 1342 apto 33, Pompéia –
São Paulo, SP - CEP: 05020-000,
cspizzutto@yahoo.com.br

Recebido para publicação: 05/07/2007

Aprovado para publicação: 28/08/2008

Introdução

A meta do enriquecimento ambiental é criar ambientes físicos que promovam respostas dos animais frente aos estímulos; estas respostas podem variar dependendo da intensidade, duração do agente estressor e da habilidade do animal de interagir com ele.¹ Muitos tipos de agentes estressores agudos podem acarretar em um aumento geral da excitação, que por sua vez pode trazer benefícios fisiológicos e psicológicos

para o animal.² Recentes estudos examinaram simultaneamente categorias de parâmetros endócrinos e comportamentais na tentativa de avaliar o bem-estar psicológico, tendo nas variações dos níveis de cortisol um indicador indireto da intensidade na resposta a estímulos estressantes.³

As aplicações e validações de técnicas de mensuração hormonal têm aumentado nos últimos 10 anos. O desenvolvimento destes métodos se deu principalmente pela necessidade de se complementar dados

comportamentais com aspectos endócrinos. Recentes estudos que tentam correlacionar medidas comportamentais e hormonais em diversas espécies ofertam novas perspectivas sobre os custos e benefícios de estratégias comportamentais e suas correlações endócrinas, além de possibilitar um entendimento mais apurado da evolução do comportamento social. A investigação do papel de cada hormônio requer atenção ao contexto social e ecológico da função endócrina, além da relação da variação comportamental e histórico de vida. Estudos revelam diferenças importantes nos valores absolutos de hormônios de animais de vida livre comparando com os de cativeiro.⁴ A significância destas diferenças tem sido investigada através de análises etológicas comparadas com níveis hormonais antes e depois de estímulos sociais e ambientais.⁵

O desenvolvimento e validação de novos e não-invasivos métodos de avaliação endócrina utilizando a extração e mensuração de metabólitos de esteróides excretados nas fezes ou na urina, foram objeto de inúmeras pesquisas em diversas espécies de mamíferos.^{6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17} Técnicas não invasivas de dosagem de metabólitos de hormônios esteróides nas fezes são agora bastante usadas para animais de vida livre ou de difícil manejo^{18,19,20,21}, como também para animais de laboratório^{22,23,24}, na investigação das relações entre hormônios e comportamento, bem-estar e reprodução^{12,25}. Tais técnicas evitam os efeitos estressantes das coletas de amostras sanguíneas que podem comprometer seriamente os resultados de um experimento.

Este trabalho teve por objetivo realizar as validações laboratorial e fisiológica de um conjunto comercial originalmente desenvolvido para mensurar corticosterona sérica humana, para permitir o seu uso para mensurar corticóides fecais (CF) de duas espécies de primatas não-humanos.

Material e Método

Foram estudados três exemplares de chimpanzés (*Pan troglodytes*), adultos, sendo

duas fêmeas e um macho, e um exemplar fêmea, adulto, de orangotango (*Pongo pygmaeus*), mantidos em cativeiro de dois diferentes zoológicos.

Para a avaliação dos CF foram colhidas amostras fecais três vezes por semana ao longo de seis meses. As amostras foram colhidas sempre no início da manhã, homogeneizadas, acondicionadas em sacos plásticos do tipo “ziplock” e mantidas em freezer à -20°C até serem processadas no Laboratório de Dosagens Hormonais do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

As amostras fecais foram pesadas e liofilizadas com o auxílio do aparelho evaporador giratório tipo *Speed vac* (*Speed vac* – Sc110, Savant), para garantir a ausência de ação bacteriana e padronização do teor de umidade e do peso do material fecal.

As extrações dos esteróides fecais foram realizadas segundo técnica preconizada por Whitten et al.²⁶ para fezes de chimpanzés (*Pan troglodytes*), brevemente descrita a seguir: uma alíquota de 0,2 g de fezes secas foi fervida em 5 ml de etanol 90% (90% etanol: água destilada) por 25 minutos; durante este tempo, o etanol evaporado foi gradativamente repostado, de forma que ao final desta etapa, o volume inicial fosse mantido. Após centrifugação por 15 minutos a 500 G, o sobrenadante foi recuperado e o *pellet* resultante foi re-suspendido em 5 ml de etanol 90%, homogeneizado em aparelho de vórtex (PHOENIX, MOD AT 56) e re-centrifugado. Os dois sobrenadantes foram combinados e secos completamente sob ar comprimido. O extrato seco foi, então redissolvido em 1 ml de metanol absoluto.

Para as dosagens de CF, as amostras foram diluídas 1:10 em diluente do próprio conjunto comercial. Foi utilizado conjunto comercial para radioimunoensaio ImmunuChem™ Double Antibody Corticosterone da *MP Biomedicals*, New York, que utiliza I¹²⁵ como elemento traçador e as contagens foram realizadas em contador gama computadorizado Cobra, Mod. Auto-Gamma®. Diluições seriadas de uma

amostra foram dosadas para determinação da melhor diluição em tampão de ensaio para a dosagem das amostras. A diluição 1:10 foi considerada a mais adequada. Foi obedecido para o ensaio o protocolo sugerido pelo fabricante. Os parâmetros de controle de qualidade do ensaio foram a sensibilidade (menor concentração detectada) e os coeficientes de variação inter e intra-ensaios. O anticorpo usado é altamente específico apresentando menos de 0,34% de reação cruzada com os outros corticóides de ocorrência natural.

As concentrações de CF foram expressas em ng/ml de extrato fecal diluído e, posteriormente convertidos para nanogramas por gramas (ng/g) de fezes secas.

Foi realizada a validação do conjunto diagnóstico para uso em extrato fecal de primatas, pelo método de paralelismo utilizando matriz íntegra. Para tanto foi constituído um “pool” de amostras de baixa concentração hormonal (valores próximos aos limites inferiores da curva padrão) e a esta amostra adicionou-se valores conhecidos do padrão de corticosterona do conjunto, em diluições seriadas semelhantes às da curva de calibração do ensaio. Feito isto foi realizada uma análise de regressão linear simples, utilizando ambas as curvas.

A validação fisiológica foi realizada através da comparação entre as médias das concentrações de CF medidas em cada uma das duas fases: Base (antes da introdução dos enriquecimentos) e a de Habituação (imediatamente após a introdução).

As concentrações de CF nas duas fases foram descritas como médias \pm erros padrão da média (EPM). Os dados foram analisados através do programa SAS System for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2000). Na análise da validação fisiológica, as médias das concentrações dos CF nas diferentes etapas, foram comparadas pelo teste de Wilcoxon, com 95%. Na validação laboratorial, a verificação da existência de paralelismo, foi realizada com o uso de uma análise de

regressão linear simples.

Resultados

O controle de qualidade dos ensaios de radioimunoensaio foi realizado através da análise dos coeficientes de variação intra-ensaio (CV intra): 12,75% inter-ensaio (CV inter): 2,21% e sensibilidade mínima detectada: 2,55 ng/dl.

Os altos coeficientes de correlação $r = 0,993$ (r^2 ajustado = 0,987, $y = 17,228 + 1,31x$) para chimpanzé (Figura 1), $r = 0,998$ (r^2 ajustado = 0,996, $y = 11,144 + 1,293x$) para orangotango (Figura 2) comprovaram o paralelismo entre as curvas obtidas a partir de diluições seriadas de *pools* de extratos e a curva padrão do conjunto comercial.

As concentrações médias dos CF

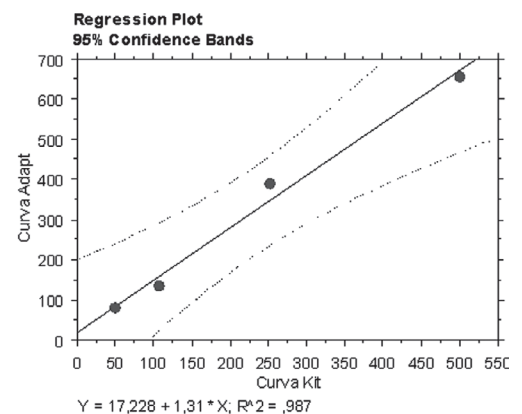


Figura 1 - Representação gráfica da curva de paralelismo obtida para CF de chimpanzés (*Pan troglodytes*) utilizando matriz íntegra

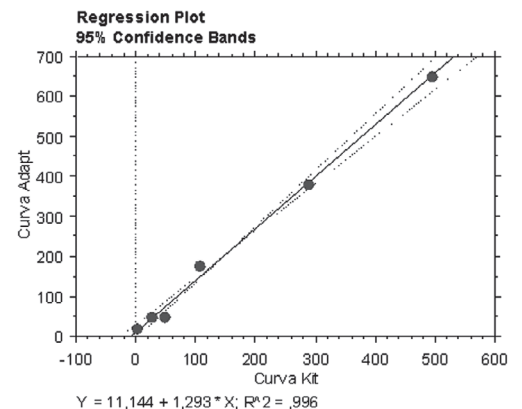


Figura 2 - Representação gráfica da curva de paralelismo obtida para CF de orangotango (*Pongo pygmaeus*) utilizando matriz íntegra

foram: chimpanzé: Base (5,90 +/- 2,41x10³ ng/g), Habituação (14,92 +/- 4,66x10³ ng/g); orangotango: Base (91,1 +/- 30,0 x10³ ng/g), Habituação (185,1 +/- 57x10³ ng/g). Houve diferença significativa (P<0,05) entre as concentrações destes metabólitos fecais medidas nas duas fases para ambas as espécies (Figuras 3 e 4).

Discussão e Conclusões

Atualmente, no meio científico, o conceito de estresse não encontra consenso entre pesquisadores, justamente por ser um mecanismo de adaptação.²⁷ No entanto, Boere²⁸ o define como sendo um mecanismo de defesa do organismo para os desafios cotidianos ou extraordinários envolvendo primariamente vias neuroendócrinas que sustentam o comportamento adaptativo.

Para os vertebrados, normalmente, os

ambientes não são estáticos e os animais têm que se adaptar à situações diversas por modificações fisiológicas, morfológicas e comportamentais. Os componentes não previsíveis promovem o chamado “estágio de emergência”, que resulta em mudanças nos parâmetros endócrinos e metabólicos de um organismo.^{29,30} A manutenção dos estímulos pode conduzir o organismo a um estado de estresse crônico, onde os níveis aumentados de glicocorticóides são mantidos e poderão ocorrer quadros patológicos, como imunossupressão, ulcerações em trato gastrointestinal e hipertrofia/hiperplasia da córtex adrenal.^{31,32,33,34,35,36,37,38}

Após um estímulo, ocorre um aumento imediato dos níveis dos esteróides, no entanto, os efeitos destes hormônios podem ocorrer 24-48 horas após o estímulo hormonal original ter desaparecido.³⁹

Uma vez metabolizados, os esteróides

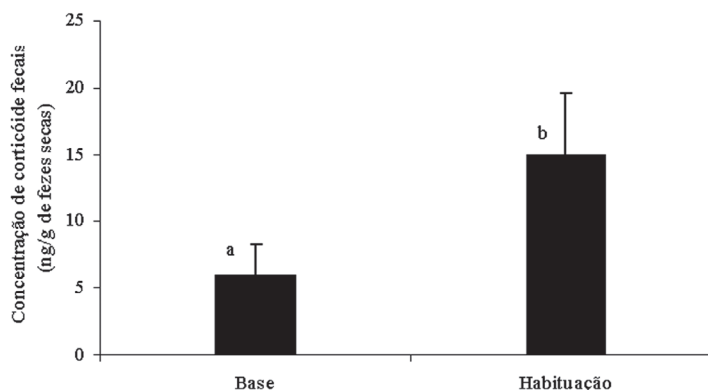


Figura 3 - Níveis (média ± desvio padrão) de CF (10³ng/g), de chimpanzé (*Pan troglodytes*) nas diferentes etapas do trabalho (base e habituação). São Paulo, 2003-2004 (^a e ^b: letras diferentes sobrescritas indicam diferença estatística $P < 0,05$)

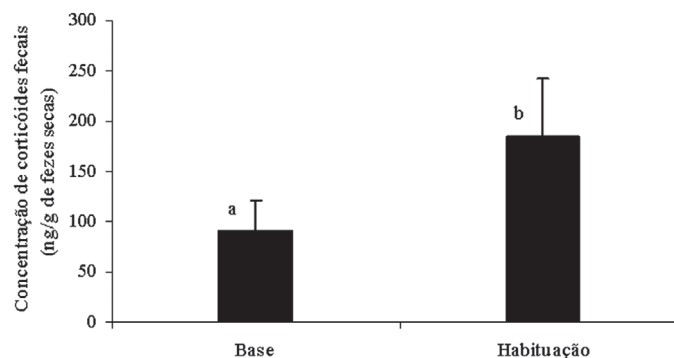


Figura 4 - Níveis (média ± desvio padrão) de CF (10³ng/g), de orangotango (*Pongo pygmaeus*) nas diferentes etapas do trabalho (base e habituação). São Paulo, 2003-2004 (^a e ^b: letras diferentes sobrescritas indicam diferença estatística $P < 0,05$)

são excretados por diversas vias, inclusive a fecal.⁴⁰ Neste caso, os esteróides poderão ser excretados nas fezes em até 3 dias após a sua secreção no sangue^{41,42,43,44}, sendo que este intervalo poderá variar de acordo com a espécie. Os metabólitos fecais de corticosteróides representam secreções cumulativas de um grande número de horas ou até mesmo de dias, sendo por esta razão mais adequados para estudos onde os efeitos procurados se perpetuem por algum tempo, mesmo após a cessação do estímulo. Vários estudos em primatas estabeleceram correlações significativas entre corticosteróides fecais e séricos.^{14,45,46}

Era, portanto, esperado que a introdução do animal em seu ambiente enriquecido promovesse elevações significativas nos valores de corticóides fecais ao longo do período estudado. Desta forma, nossos resultados demonstraram claramente que houve variação significativa dos níveis

fecais de corticosteróides entre as diferentes fases analisadas, refletindo as variações da intensidade das respostas do organismo animal aos diferentes estímulos ambientais, neste caso, atuando como estressores. Dessa maneira, foram detectadas as alterações fisiológicas esperadas, caracterizando a validação fisiológica.

A validação laboratorial obtida pelo teste do paralelismo associada à validação fisiológica confirmam a possibilidade da utilização do conjunto comercial ImmunoChem™ Double Antibody Corticosterone da *MP Biomedicals*, para a mensuração de metabólitos fecais de corticóides, tanto em chimpanzés quanto em orangotangos.

Esta preciosa ferramenta não-invasiva, possibilitará grandes avanços no estudo da endocrinologia comportamental e da provável correlação do estresse com determinados padrões comportamentais.

Laboratorial and physiological validation of comercial kits for quantification of fecal corticoids of captive chimpanzees (*Pan troglodytes*) and orangutangs (*Pongo pygmaeus*) under environmental enriched conditions

Abstract

A comparative study of fecal corticoids (FC) concentrations was carried out with chimpanzees (*Pan troglodytes*) e orangutans (*Pongo pygmaeus*). Fecal samples were collected before (Basal) and just after (Habituation) enrichment introduction and analyzed. We performed biochemical and physiological validations of the ImmunoChem™ Double Antibody Corticosterone kit for radioimmunoassay from *MP Biomedicals* for quantifying FC concentrations. To establish the biochemical validity of our assay we performed parallelism assays in which pooled fecal extracts from both species were spiked with known quantities of corticosterone standard and the slopes of the curves obtained with these samples and the standard curves of the kits were compared. The correlation coefficients were $R^2=0.98$ ($Y= 17.23+1.31*X$) for chimpanzees and $R^2=0.99$ ($Y=11.14+1.29*X$) for orangutans. For biological validation, we used the introduction of environmental enrichment to trigger a rise in FC levels as a consequence of the response to a stressor. Concentrations were expressed as mean and SEM. Mean concentrations of fecal corticosteroids were: Basal: $5.90 \pm 2.41 \times 10^3$ ng/g of feces, Habituation: $14.92 \pm 4.66 \times 10^3$ ng/g of feces for chimpanzees and Basal: $91.1 \pm 30.0 \times 10^3$ ng/g of feces, Habituation: $185.1 \pm 57 \times 10^3$ ng/g of feces for orangutans. For both species, the mean concentrations of Basal and Habituation periods were significantly different.

Key words:

Physiological validation.
Biochemical validation.
Fecal corticosteroids.
Chimpanzee (*Pan troglodytes*).
Orangutan (*Pongo pygmaeus*)

Referências

- 1 CARLSTEAD, K.; SHEPHERDSON, D. Effects of environmental enrichment on reproduction. **Zoo Biology**, v. 13, p. 447-458, 1994.
- 2 NATELSON, B. H.; CREIGHTON, D.; MC CARTY, R.; TAPP, W. N.; PITMAN, D.; OTTENWEILER, J. E. Adrenal hormonal indices of stress in laboratory rats. **Physiology and Behavior**, v. 39, p. 117-125, 1987.
- 3 CLARKE, A. S.; CZEKALA, N. M.; LINDBURG, D. G. Behavior and adrenocortical responses of male cynomolgus and lion-tailed macaques to social stimulation and group formation. **Primates**, v. 36, p. 41-56, 1995.
- 4 WINGFIELD, J. C.; MOORE, M. C. Hormonal, social, and environmental factors in the reproductive biology of free living male birds. In: CREWS, D. **Psychobiology of reproductive behavior: an evolutionary perspective**. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall, 1987. p. 149-175.
- 5 KETTERSON, E. D.; NOLAN JR., V. Hormones and life histories: an integrative approach. **American Naturalist**, v. 140, p. 33-62, 1992.
- 6 ASA, C. S.; FISCHER, F.; CARRASCO, E.; PURICELLI, C. Correlation between urinary pregnanediol glucuronide and basal body temperature in female orangutans, *Pongo pygmaeus*. **American Journal of Primatology**, v. 34, p. 275-281, 1994.
- 7 BELLEN, A. C.; MONFORT, S. L.; GOODROWE, K. L. Monitoring reproductive development, menstrual cyclicity, and pregnancy in the lowland gorilla (*Gorilla gorilla*) by enzyme immunoassay. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 26, p. 24-31, 1995.
- 8 BROCKMAN, D. K.; WHITTEN, P. L. Reproduction in free-ranging *Propithecus verreauxi*: estrus and the relationship between multiple partner matings and fertilization. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 100, p. 57-69, 1996.
- 9 BROCKMAN, D. K.; WHITTEN, P. L.; RUSSEL, E.; RICHARD, A. F.; IZARD, M. K. Application of fecal steroid techniques to the reproductive endocrinology of female Verreaux's sifakas (*Propithecus verreauxi*). **American Journal of Primatology**, v. 36, p. 313-325, 1995.
- 10 BROWN, J. L.; WILDT, D. E.; GRAHAM, L. H.; BYERS, A. P.; COLLINS, L.; BARRETT, S.; HOWARD, J. Natural versus chorionic gonadotropin-induced ovarian responses in the clouded leopard (*Neofelis nebulosa*) assessed by fecal steroid analysis. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 93-102, 1995.
- 11 CZEKALA, N. M.; GALLUSSER, S.; MEIER, J. E.; LASLEY, B. L. The development and application of an enzyme immunoassay for urinary estrone conjugates. **Zoo Biology**, v. 5, p. 1-6, 1986.
- 12 SCHWARZENBERGER, F.; MÖSTL, E.; PALME, R.; BAMBERG, E. Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 515-526, 1996.
- 13 SHIDELER, S. E.; CZEKALA, N. M.; KASMAN, L. H.; LINDBURG, D. G.; LASLEY, B. L. Monitoring ovulation and implantation in the lion-tailed macaque (*Macaca silenus*) through urinary estrone conjugate evaluations. **Biology of Reproduction**, v. 29, p. 905-911, 1983.
- 14 STAVISKY, R. C.; RUSSELL, E.; STALLINGS, J.; SMITH, E. O.; WORTHMAN, C. M.; WHITTEN, P. L. Fecal steroid analysis of ovarian cycles in free ranging baboons. **American Journal of Primatology**, v. 36, p. 285-297, 1995.
- 15 STRIER, K. B.; ZIEGLER, T. E. Insights into ovarian function in wild muriqui monkeys (*Brachyteles arachnoides*). **American Journal of Primatology**, v. 32, p. 31-40, 1994.
- 16 WHITTEN, P. L.; BROCKMAN, D. K.; STAVISKY, R. C. Recent advances in noninvasive techniques to monitor hormone-behavior interactions. **Yearbook of Physical Anthropology**, v. 41, p. 1-23, 1998.
- 17 ZIEGLER, T. E.; SANTOS, C. V.; PISSINATI, A.; STRIER, K. B. Steroid excretion during the ovarian cycle in captive and wild muriqui (*Brachyteles arachnoides*). **American Journal of Primatology**, v. 42, p. 311-321, 1997.
- 18 BROWN, J. L.; WASSER, S. K.; WILDT, D. E.; GRAHAM, L. H. Comparative measured non-invasively in feces. **Biology of Reproduction**, v. 51, p. 776-786, 1994.
- 19 GRAHAM, L.; SCHWARZENBERGER, F.; MOSTL, E.; GALAMA, W.; SAVAGE, A. A versatile enzyme immunoassay for the determination of progestagens in feces and serum. **Zoo Biology**, v. 20, p. 227-236, 2001.
- 20 MORAIS, R. N.; MUCCILOLO, R. G.; GOMES, M. F. L.; LACERDA, O.; MORAES, W.; MOREIRA, N.; GRAHAM, L. H.; SWANSON, W. F.; BROWN, J. L. Seasonal analysis of semen characteristics, serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. wiedii*) and tigrina (*L. tigrinus*). **Theriogenology**, v. 57, p. 2027-2041, 2002.
- 21 PEREIRA, R. J. G.; POLEGATO, B. F.; SOUZA, S.; NEGRÃO, J. A.; DUARTE, J. M. B. Monitoring ovarian cycles and pregnancy in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) by measurement of fecal progesterone metabolites. **Theriogenology**, v. 65, p. 387-399, 2006.
- 22 CAVIGELLI, S. A.; MONFORT, S. L.; WHITNEY, T. K.; MECHREF, Y. S.; NOVOTNY, M.; MCCLINTOCK, M. K. Frequent serial fecal corticoid measures from rats reflect circadian and ovarian corticosterone rhythms. **Journal of Endocrinology**, v. 184, p. 153-163, 2005.
- 23 CHELINI, M. O. M.; SOUZA, N. L.; ROCHA, A. M.; FELIPPE, E. C. G.; OLIVEIRA, C. A. Quantification of fecal estradiol and progesterone metabolites in Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). **Brazilian Journal of**

- Medical Biological Research**, v. 38, p. 1711–1717, 2005.
- 24 HAYSEN, V.; HARPER, J. M.; DEFINA, R. Fecal corticosteroids in agouti and nonagouti deer mice (*Peromyscus maniculatus*). **Comparative Biochemistry Physiology**, v. 132, p. 439–446, 2002.
- 25 TOUMA, C.; PALME, R. Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: the importance of a biological validation. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 1046, p. 54–74, 2005.
- 26 WHITTEN, P. L.; STAVISKY, R.; AURELI, F.; RUSSEL, E. Response of fecal cortisol to stress in captive chimpanzees (*Pan troglodytes*). **American Journal of Primatology**, v. 44, p. 57–69, 1998 .
- 27 BREZNITZ, S.; GOLDBERGER, L. Stress research at a crossroads. In: BREZNITZ, S.; GOLDBERGER, L. **Handbook of stress**. New York: The Free Press, 1986. 819 p.
- 28 BOERE, V. **Efeitos do estresse psicossocial crônico e do enriquecimento ambiental em sagüis (*Callithrix penicillata*): um estudo comportamental, fisiológico e farmacológico**. 2002. 238 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- 29 MÖSTL, E.; PALME, R. Hormones as indicators of stress. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p. 67–74, 2002.
- 30 DOBSON, H.; SMITH, R. F. What is stress, and how does it affect reproduction? **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 743-752, 2000.
- 31 ENGEL, G. L. A psychological setting of somatic disease: the giving up-given up complex. **Proceedings of the Royal Society of Medicine**, v. 60, p. 553-555, 1967.
- 32 BARNETT, J. L.; CRONIN, G. M.; WINFIELD, C. G.; DEWAR, A. M. The welfare of adult pigs: effects of 5 housing treatments on behavior, plasma corticosteroids, and injuries. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 12, p. 209-232, 1984.
- 33 MOBERG, G. P. Influence of stress on reproduction: measure of well-being. In: MOBERG, G. P.; MENCH, J. A. **Biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare**. London: CABI Publishing, 1985. p. 245-267.
- 34 ELASSER, T. H.; KLASING, K. C.; FILIPOV, N.; THOMPSON, F. The metabolic consequences of stress: targets for stress and priorities of nutrient use. In: MOBERG, G. P.; MENCH, J. A. **Biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare**. London: CABI Publishing, 2000. p. 77-110.
- 35 CARLSTEAD, K.; BROWN, J. L.; MONFORT, S. L.; KILLENS, R.; WILDT, D. E. Validation of a urinary cortisol radioimmunoassay for non-invasive monitoring of adrenal activity in domestic and non-domestic fields. **Zoo Biology**, v. 11, p. 165-176, 1992.
- 36 LIPTRAP, R. M. Stress and reproduction in domestic animals. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 697, p. 275-284, 1993.
- 37 DOBSON, H.; SMITH, R. F. Stress and reproduction in farm animals. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 49, p. 451-461, 1995.
- 38 PEEL, A. J.; VOGELNEST, L.; FINNIGAN, M.; GROSSFELDT, L.; O'BRIEN, J. K. Non-invasive fecal hormone analysis and behavioral observations for monitoring stress responses in captive western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*). **Zoo Biology**, v. 24, p. 431-445, 2005.
- 39 O'MALLEY, B. W.; SCHRADER, W. T.; TSAI, M. J. Molecular actions of steroid hormones. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 196, p. 1-10, 1986.
- 40 ZIEGLER, T. E.; SCHEFFLER, G.; WITTEW, D. J.; SCHULTZ-DARKEN, N.; SNOWDON, C. T.; ABBOTT, D. H. Metabolism of reproductive steroids during the ovarian cycle in two species of Callitrichids, *Saguinus Oedipus* and *Callithrix jacchus*, and estimation of the ovulatory period from fecal steroids. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 91-99, 1996.
- 41 ZIEGLER, T. E.; SHOLL, S. A.; SCHEFFLER, G.; HAGGERTY, M. A.; LASLEY, B. L. Excretion of estrone, estradiol and progesterone in the urine and feces of the female cotton-top tamarin *Saguinus oedipus Oedipus*. **American Journal of Primatology**, v. 17, p. 185-195, 1989.
- 42 HEISTERMANN, M.; TARI, S.; HODGES, J. K. Measurement of faecal steroids for monitoring ovarian function in new world primates, callitrichidae. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 99, p. 243-251, 1993.
- 43 SHIDELER, S. E.; ORTUNO, A. M.; MORAN, F. M.; MOORMAN, E. A.; LASLEY, B. L. Simple extraction and enzyme immunoassay for estrogen and progesterone metabolites in the feces of *Macaca fascicularis* during nonreceptive and conceptive ovarian cycles. **Biology of Reproduction**, v. 48, p. 1290-1298, 1993.
- 44 WASSER, S. K.; MONFORT, S. L.; SOUTHERS, J.; WILDT, D. E. Excretion rates and metabolites of oestradiol and progesterone in baboon (*Papio cynocephalus cynocephalus*) faeces. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 101, p. 213-220, 1994.
- 45 WHITTEN, P. L. Noninvasive methods for the study of stress, reproductive function, and aggression. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 24, p. 239, 1997.
- 46 WASSER, S. K.; BEVIS, K.; KING, G.; HANSON, E. Noninvasive physiological measures of disturbance in the Northern Spotted Owl. **Conservation Biology**, v. 11, p. 1019, 1022, 1997.