

Quantificação de esteróides fecais de fêmeas de onça-pintada (*Panthera onca*) mantidas em cativeiro: validação da técnica

Priscila VIAU¹
Érika Cristiane Gutierrez
FELIPPE¹
Cláudio Alvarenga de
OLIVEIRA¹

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

Correspondência para:

PRISCILA VIAU
Laboratório de Cirurgia Cardiorácica
Departamento de Cirurgia
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia - USP
Av. Prof. Orlando Marques de Paiva, 87
Cidade Universitária "Aramando de Salles de
Oliveira"
05508-270 - São Paulo - SP
priviau@usp.br

Recebido para publicação: 30/10/2003
Aprovado para publicação: 15/03/2005

Resumo

Foi estudada a atividade ovariana de fêmeas de onça-pintada (*Panthera onca*; adultas n=2 e pré-púberes n=3) mantidas em cativeiro, pela extração e quantificação de estrógenos e progestinas fecais. Foram colhidas amostras fecais de 2-7 vezes por semana durante 16-18 meses. Foi realizada a validação dos radioimunoensaios em fase sólida, para progesterona e 17 β -estradiol, para uso em extratos fecais em onça-pintada. A concentração média de estrógenos fecais (ng/g de fezes secas) para o grupo dos animais pré-púberes foi de 10,97 (variando de 0,28 a 59,16) e para o grupo dos animais adultos foi de 68,99 (variando de 3,50 a 609,37). A concentração média de progestinas fecais (μ g/g de fezes secas) para o grupo dos animais pré-púberes foi de 0,26 (variando de 0,02 a 4,44) e para o grupo dos animais adultos foi de 0,85 (variando de 0,08 a 6,51).

Palavras-chaves:

Animais silvestres.
Esteróides.
Radioimunoensaio.

Introdução

Os carnívoros têm sido parte do ambiente, cultura e da mitologia humana por milhões de anos. A onça-pintada é um símbolo que tem alto significado ritual para as civilizações pré-colombianas no México, América Central e comunidades indígenas na América do Sul¹. Entretanto, a maioria das espécies de felinos silvestres sofre o risco de extinção em virtude da acentuada destruição de seu habitat, caça predatória e comércio ilegal. A utilização irracional dos recursos naturais, sem um trabalho concreto para sua recomposição ou conservação, está causando uma irreparável perda da biodiversidade^{2,3,4}.

Os carnívoros que ocupam o topo da cadeia alimentar são de grande importância ecológica, pois podem regular a população de presas naturais e, desta forma, influenciar toda a dinâmica do ecossistema em que vivem². Na ausência de predadores, suas presas naturais tendem a se multiplicar exponencialmente, podendo causar sérios

prejuízos à agricultura¹.

A onça-pintada está listada no Apêndice A do Red Data Book da União Internacional para Conservação da Natureza⁵ como animal quase ameaçado de extinção, e encontra-se na categoria dos animais vulneráveis da Lista das Espécies Ameaçadas de Extinção da Fauna Brasileira⁶.

Dentre as estratégias de conservação, as técnicas de reprodução assistida são importantes ferramentas na preservação da onça-pintada, permitindo contribuir com as populações em vida livre⁷. No entanto, o sucesso de aplicação destas técnicas estará dependente do conhecimento da biologia reprodutiva da espécie⁸.

Estudos realizados com infusão de hormônios radio-marcados permitiram constatar que mais de 90% dos metabólitos esteróides em gatos domésticos são eliminados nas fezes⁹. A partir daí, radioimunoensaios foram validados para a quantificação dos níveis de estrógenos e progestágenos⁹, andrógenos¹⁰ e corticóides¹¹ nas fezes de várias espécies de felinos não

domésticos.

A análise hormonal de esteróides fecais em animais silvestres é vantajosa, por permitir o monitoramento há longo prazo da função gonadal, refletida de maneira mais fisiológica, sem que haja necessidade de impor aos animais uma situação adicional de estresse, que é a colheita de amostras de sangue^{12,13,14}.

O uso destas técnicas, em diversas espécies de felinos, tem permitido estudos comparativos da dinâmica da função ovariana^{9,15,16,17}, testicular^{7,17,18,19} e adrenocortical^{11,14,20} entre espécies e indivíduos. Desta forma, é possível obter informações acerca do estado puberal, da influência das estações do ano sobre a reprodução e, ainda, diagnosticar possíveis causas de sub-fertilidade e infertilidade¹⁸. Este trabalho demonstra a validade da dosagem de estrógenos e progestinas nas fezes de fêmeas de onça-pintada. Para isso, quantificamos por meio de radioimunoensaio os metabólitos de estrógenos e progestinas nas fezes de fêmeas adultas, sexualmente maduras, e de fêmeas pré-púberes de onça-pintada.

Materiais e Métodos

Animais

Foram utilizadas cinco fêmeas de onça-pintada (*Panthera onca*), sendo duas adultas e três pré-púberes, com padrão de coloração amarela com manchas pretas. Os animais foram divididos em dois grupos: animais adultos (grupo AA) e animais pré-púberes (grupo PP). Os animais adultos eram de procedência desconhecida. Eles eram mantidos na Fundação Parque Zoológico de São Paulo – FPZSP (AA-01) e na Fundação Rio-Zoo (FRZ) do Rio de Janeiro (AA-02), em recintos individuais no setor extra de cada zoológico, porém com contato visual e/ou olfativo com machos e fêmeas da mesma e de outras espécies.

No grupo PP, duas fêmeas eram da mesma ninhada, procedentes da Região do Rio Negro – Pantanal pertencentes ao Parque Zoológico Municipal “Quinzinho de Barros”- Sorocaba/SP (PP 01 e PP 02). A idade média estimada dessas fêmeas era de 11 meses no início do experimento. Elas foram mantidas junto com um macho, da

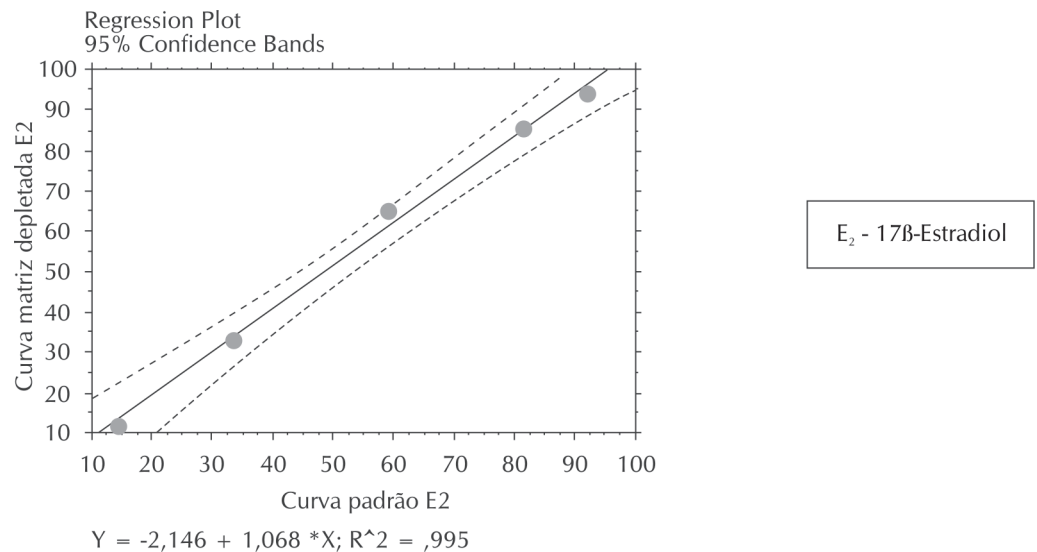


Figura 1- Representação gráfica da curva de paralelismo obtido para estrógenos fecais de fêmeas de onça-pintada utilizando a matriz depletada. São Paulo, 2003

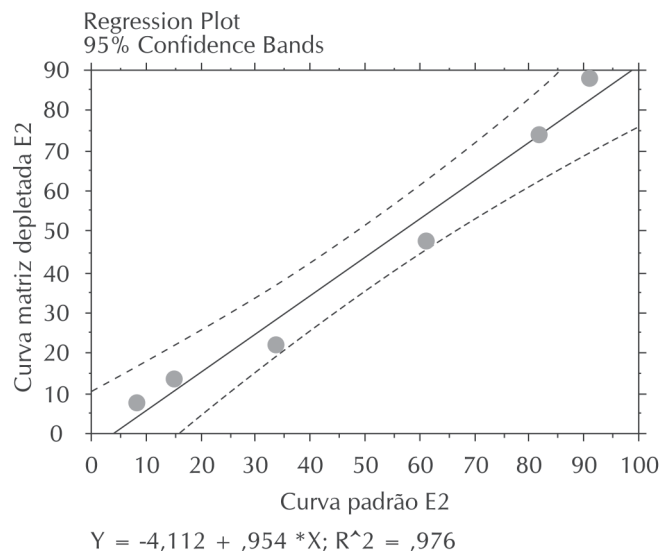
E₂ - 17β-Estradiol

Figura 2- Representação gráfica da curva de paralelismo obtido para estrógenos fecais de fêmeas de onça-pintada utilizando a matriz íntegra. São Paulo, 2003

mesma cria, no setor de exposição ao público. A terceira fêmea era procedente de Anaurilândia – MS, pertencente ao Centro de Conservação da Fauna Silvestre Ilha Solteira – CESP/SP (PP 03). A idade média estimada para esta fêmea foi de 15 meses, no início do experimento. Ela foi mantida em recinto individual no setor de exposição ao público, porém com contato visual e olfativo com um macho da mesma ninhada. Todos os animais estiveram expostos ao

ambiente (fotoperíodo, temperatura e umidade do ar), tinham acesso livre à água e a dieta alimentar era oferecida à tarde conforme rotina empregada pelas instituições.

Colheita e Transporte do Material Fecal

Para o monitoramento não invasivo da função ovariana foram colhidas amostras fecais, de 2 a 7 vezes por semana. A colheita das amostras obtidas do grupo AA foi

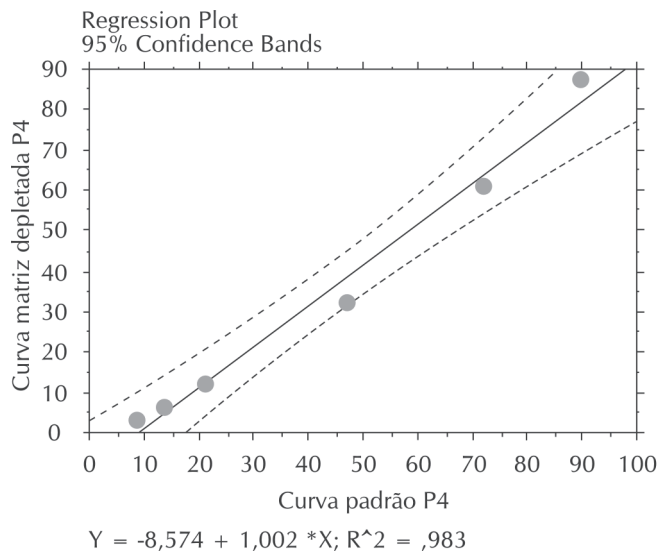
P₄ - Progesterona

Figura 3- Representação gráfica da curva de paralelismo obtido para progestinas fecais de fêmeas de onça-pintada utilizando a matriz depletada. São Paulo, 2003

realizada durante aproximadamente 18 meses, e no grupo PP durante aproximadamente 16 meses. Cada amostra recolhida foi acondicionada em coletores plásticos (5,0 ml) desenvolvidos especialmente para resistir a baixas temperaturas e para não permitir vazamentos ou penetrações de umidade. As amostras foram devidamente identificadas quanto ao número do animal e a data da colheita.

As amostras foram armazenadas em botijão de nitrogênio líquido (-196°C), até o momento do seu transporte para o Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH/FMVZ-USP), onde foram armazenadas em freezer a - 20°C, até o descongelamento para realização do processo de extração hormonal.

Processamento das Amostras

As amostras foram pesadas, liofilizadas em aparelho giratório tipo speed vac (Speed Vac SC110), Savant Instruments, Inc., NY, 11741-4306, USA) por 24 horas e pesadas novamente para obtenção da porcentagem de umidade de cada amostra. A etapa de liofilização garantiu a padronização do peso do material fecal que foi utilizado.

Extração

Utilizou-se, na extração dos estrógenos e das progestinas fecais, a técnica de Brown et al.⁹. Em tubos de ensaio de vidro (15ml), devidamente identificados, foram colocadas alíquotas de 0,2g de fezes secas, ao qual foram adicionados 5ml de etanol (Etanol, P.A.- Merck) a 90% (90% etanol:10% água destilada). Fez-se o aquecimento a 90°C em banho-maria (QUIMIS) dentro da capela do laboratório, até 25 minutos após iniciada a fervura. Durante esse tempo o etanol evaporado foi sendo gradativamente repostado para que nenhuma amostra ficasse seca. Após a fervura, o volume final em cada tubo foi de 5ml. O material foi homogeneizado em aparelho vortex (Phoenix, MOD AT 56) e, a seguir, centrifugado a 500g por 15 minutos

(QUIMIS). Ao final, o sobrenadante foi transferido para tubos limpos. O pellet resultante desta primeira centrifugação foi homogeneizado novamente em 5ml de etanol 90%, sendo agitado por 30 segundos e centrifugado por 15 minutos. Os dois sobrenadantes foram, então, combinados num único tubo e secos por completo no fluxo (LÁCTEA) sob ar comprimido (MSI 5,2 ML/100). O extrato seco resultante foi reconstituído em 1ml de metanol (Metanol, P.A. Merck), através de agitação no aparelho Multi Vortex (VWR Scientific products, VX – 2500) por 5 minutos. Esse extrato foi levado para o banho-ultrassônico (Ultra Sonic Cleaner, USC – 1450 –Unique) por 15 minutos, sendo, em seguida armazenado em freezer (-20°C) onde permaneceu até a etapa de dosagem hormonal. Nesta etapa, as amostras foram diluídas em tampão gelatina [NaPO₄ (13,8g), NaCl (9,0g), azida sódica (1,0g) e água destilada (1000ml), pH 7,0], em proporções que variaram de 1/10 a 1/40 para os dois hormônios estudados.

Recuperação

O monitoramento da eficiência da extração foi realizado em dois laboratórios distintos. A recuperação do estradiol marcado ³H (Estradiol – 2,4-³H, code E9767-Sigma-250μCi) foi realizada no Laboratório de Endocrinologia da Escola Paulista de Medicina – UNIFESP, e a progesterona marcada ³H ([1,2,6,7,16,17-³H] Progesterone code TRK 641- Pack Size- 250μCi) foi recuperada no Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular (LFEM) do Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal – VRA-Campus Pirassununga/FMVZ-USP.

Em cada tubo de extração foram adicionados 100μl de cada hormônio marcado com atividade ~ 7.000 cpm. Ao final do procedimento, uma alíquota de 100μl do extrato reconstituído em metanol foi transferida para tubos contendo 2ml de líquido de cintilação (Optiphase “HiSafe”3 – Wallac Scintillation Products) e levado para contagem em contador β (Tri-Carb Liquid

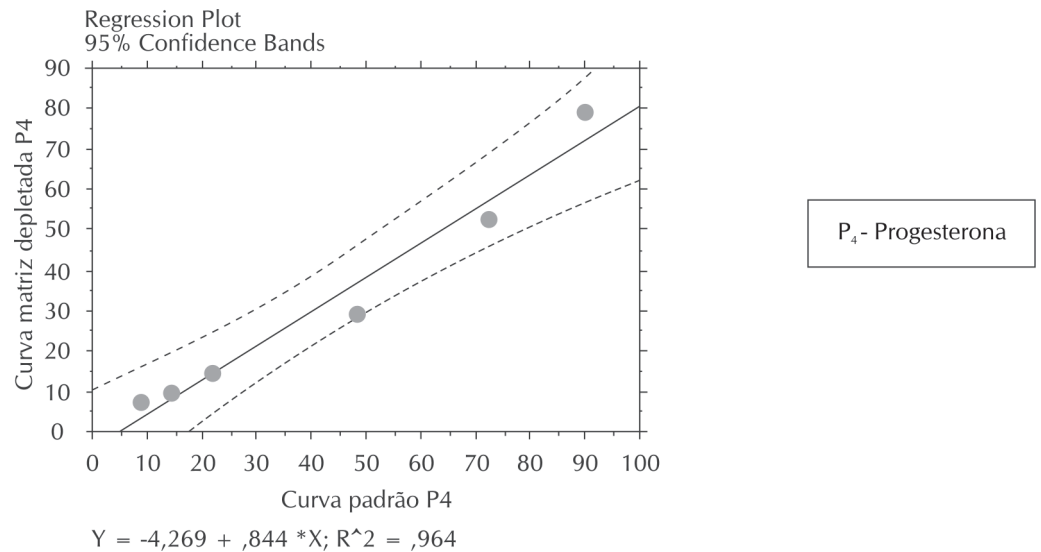


Figura 4 - Representação gráfica da curva de paralelismo obtido para progestinas fecais de fêmeas de onça-pintada utilizando a matriz íntegra. São Paulo, 2003

Scintillation Analyzers 1900TR, Packard Instrument Co., CT, 06450, USA).

Dosagens Hormonais

Para dosagem dos estrógenos e das progestinas fecais utilizou-se a técnica de radioimunoensaio (RIE) em fase sólida, por meio de conjunto diagnóstico comercial (COAT-A-COUNT, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA) desenvolvido para avaliação quantitativa de progesterona (P₄) e estradiol (E₂) no soro humano.

Este conjunto diagnóstico utiliza como elemento traçador o hormônio marcado com ¹²⁵I e segundo o protocolo do fabricante apresenta pouca reação cruzada com os metabólitos específicos para cada hormônio estudado. Foram determinados 10 ensaios para as dosagens hormonais de cada hormônio pesquisado. Para verificação do coeficiente de variação, foi utilizado um “pool” de amostras fecais em todos os ensaios hormonais. Os parâmetros levados em consideração, no controle de qualidade dos radioimunoensaios, foram a sensibilidade (concentração mínima detectada) e os coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaios.

Validação

Foi realizada a validação dos conjuntos diagnósticos comerciais DPC MEDLAB®

para uso em extrato de fezes de fêmeas de onça-pintada utilizando-se dois métodos de paralelismo, descritos abaixo.

Paralelismo utilizando matriz depletada: Indica se os hormônios da espécie estudada estão interagindo com o anticorpo do conjunto diagnóstico de forma similar ao hormônio usado como padrão.

Foi realizada a depleção hormonal de um “pool” de amostra com uma solução de carvão-dextran^{21,22}. A essa matriz depletada adicionamos valores conhecidos do hormônio padrão, com diluições que se aproximavam dos pontos da curva do conjunto diagnóstico. Com esta diluição construímos uma curva correlacionando estes valores.

Paralelismo utilizando matriz íntegra: indica se o material utilizado está interferindo na ligação antígeno – anticorpo.

Foi utilizado um “pool” de amostras de baixa concentração hormonal (valores próximos aos limites inferiores da curva padrão). A esta amostra adicionamos valores conhecidos de P₄ e E₂, a fim de aproximá-los dos pontos da curva padrão fornecida pelo conjunto diagnóstico.

Validação Fisiológica

Realizamos a validação fisiológica

através da comparação dos resultados de estrógenos e progestinas fecais, obtidos no grupo dos animais pré-púberes (fase antes do início da atividade ovariana), com os resultados obtidos no grupo dos animais adultos.

Transformação das concentrações determinadas por Radioimunoensaio

As concentrações determinadas primariamente por RIE foram expressas para progesterona em ng/ml e para estradiol em pg/ml. Para melhor adequação dos resultados ao extrato do qual ele foi obtido, foi necessária sua conversão para mg/g de fezes secas e ng/g de fezes secas, respectivamente.

Análise Estatística

Os dados referentes às concentrações hormonais foram expressos em função das suas médias (\pm erro padrão da média) para as fêmeas da espécie estudada. Para verificação de paralelismo nos métodos

empregados na validação dos radioimunoensaios, foi realizado uma análise de regressão simples e o índice de correlação adotado superior a 0,95²³. Na análise da validação fisiológica, as médias das concentrações dos estrógenos e progestinas fecais do grupo PP (n=3) foram comparadas pelo teste de Wilcoxon²⁴ com a média das concentrações das fêmeas adultas (n=2). Os dados foram analisados através do programa SAS System for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2000).

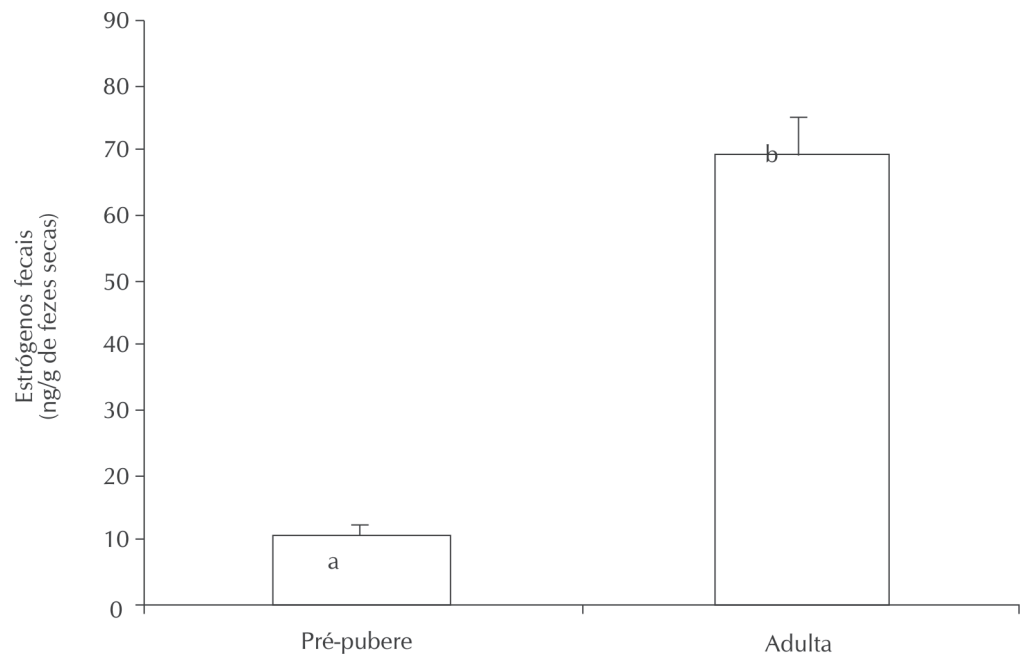
Resultados

Extração e Recuperação

Foram utilizadas 953 amostras fecais, sendo 509 para o grupo AA e 444 para o grupo PP. O percentual médio da recuperação hormonal obtido, para estrógenos fecais foi de $80 \pm 4,05$ (n=100) e para progestinas fecais foi de $89 \pm 6,09$ (n=50).

Parâmetros de Qualidade dos Ensaios Hormonais

○ controle de qualidade dos ensaios de



^{a,b} Valores com diferentes sobrescritos, em diferentes colunas, diferem significativamente ($p < 0,001$).

Figura 5 - Concentração média (\pm EPM) de estrógenos fecais (ng/g de fezes secas) de fêmeas de onça-pintada, nos diferentes grupos. São Paulo, 2003

RIE, foi realizado através da análise dos coeficientes de variação intra-ensaio, que foi inferior a 13% e inter-ensaio, inferior a 2,1%. A sensibilidade mínima detectada foi de 1,47pg/ml nos ensaios para estrógenos fecais, e de 0,005ng/ml para progestinas fecais. O “pool” de amostra fecal utilizado em todos os ensaios evidenciou um coeficiente de variação menor que 12% entre os ensaios de estrógenos fecais, e menor que 7% entre os ensaios de progestinas fecais.

Validação

Foi realizada a validação dos conjuntos diagnósticos comerciais da DPC MEDLAB[®] em fase sólida, para uso em extratos fecais em onça-pintada. Os resultados obtidos para verificação de paralelismo nos métodos empregados nas figuras 1 a 4.

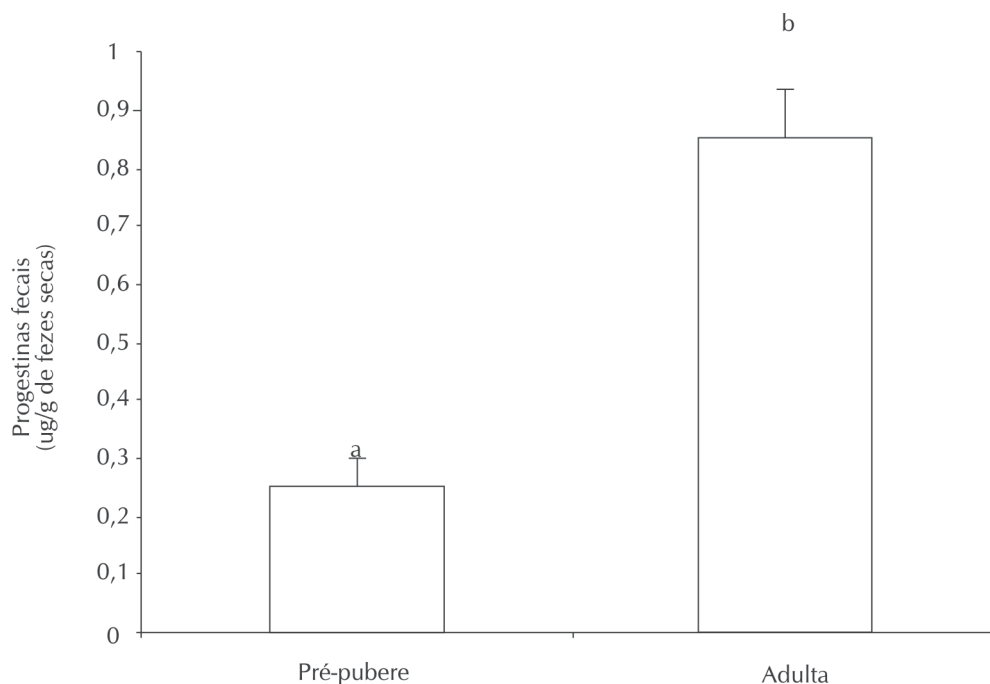
Validação Fisiológica

A concentração média de estrógenos fecais (ng/g de fezes secas) para o grupo dos animais pré-púberes foi de $10,97 \pm 0,91$ (variando de 0,28 a 59,16) e para o grupo dos animais adultos foi de

Houve diferença significativa entre as concentrações médias de estrógenos fecais e entre as concentrações de progestinas fecais ($p < 0,001$) dos grupos PP e AA (Figuras 5 e 6).

Discussão e Conclusões

Encontramos na literatura, diversos trabalhos que validaram o uso de ensaios hormonais para extratos de fezes em felinos silvestres^{9,10,15,16,18,25,26}. Outros validaram o uso de conjunto diagnóstico comercial para radioimunoensaio para quantificação de metabólitos de hormônios fecais, tanto em felinos como em outras espécies de mamíferos^{7,11,19,27,28}. Os valores obtidos nos ensaios de recuperação foram considerados satisfatórios, pois mostram que o método extrai com eficiência os hormônios adicionados e a variação entre os ensaios foi pequena. Foi verificado paralelismo entre a curva padrão do conjunto diagnóstico e as curva obtida a partir de diluição seriada de *pool* de extratos fecais, para os estrógenos e progestinas fecais. Assim, ficou demonstrado



^{a,b} Valores com diferentes sobrescritos, em diferentes colunas, diferem significativamente ($p < 0,001$).

Figura 6- Concentração média (\pm EPM) de progestinas fecais (μ g/g de fezes secas) de fêmeas de onça-pintada, nos diferentes grupos. São Paulo, 2003

matematicamente que não houve interferência da matriz íntegra (extrato fecal) na ligação do antígeno (hormônio) com o seu anticorpo, validando o uso dos conjuntos diagnósticos da DPC (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA) para a quantificação de metabólitos de estradiol e progesterona em extratos fecais de fêmeas de onça-pintada (*Panthera onca*).

No entanto, deve ser considerada a hipótese de que o anticorpo de alta especificidade do conjunto diagnóstico comercial para progesterona sérica não esteja sendo eficiente na detecção dos metabólitos, apesar de encontramos paralelismo para progestinas fecais utilizando a matriz depletada ($Y = -8,57 + 1,00 * X$; $r^2 = 0,98$) e

íntegra ($Y = -4,27 + 0,84 * X$; $r^2 = 0,96$). A avaliação do perfil hormonal antes e após um desafio com gonadotrofinas exógenas pode auxiliar na validação biológica do conjunto comercial utilizado. Alguns trabalhos, utilizando anticorpo pouco específico de progesterona com elevada porcentagem de reação-cruzada com os principais metabólitos do grupo dos pregnanes (cadeia α e β), conseguiram relacionar os seus dados com os eventos biológicos^{9,26}. Mostramos que a concentração média de estrógenos detectadas nas fezes do grupo pré-púbere foi inferior àquela medida nas fezes de fêmeas adultas, compatível com o que é citado na literatura para outras espécies de animais domésticos.

Fecal steroid and quantification in captive jaguars (*Panthera onca*): validation of a method

Abstract

Ovarian function of captive jaguars (*Panthera onca*, adults n=2 and pre-pubertal n=3) was assessed by extraction and quantification of fecal estrogens and progestins. Fecal samples were obtained 2-7 times per week during 16-18 months. Validation of solid phase radioimmunoassay for progesterone and 17 β -estradiol was performed for jaguar fecal extracts. Mean concentration the fecal estrogen (ng/g of dry feces) in pre-pubertal animals was 10,97 (range, 0,28 - 59,16) and adults animals was 68,99 (range, 3,50 - 609,37). Fecal progestins (μ g/g of dry feces) had a mean concentration of 0,26 (range, 0,02 - 4,44) in pre-pubertal animals and adults animals was 0,85 (range, 0,08 - 6,51).

Key-words:

Nondomestic species.
Steroids.
Radioimmunoassay.

Referências

- 1 LEITE, M. R. P. et al. Por que promover a conservação de carnívoros? In: _____. **Manual de identificação, preservação e controle de predação por carnívoros**. Brasília: IBAMA, 2002. 83 p.
- 2 WILDT, D. E. et al. Developing animal model systems for embryo technologies in rare and endangered wildlife. **Theriogenology**, v. 25, n. 1, p. 33-51, 1989.
- 3 LASLEY, B. L.; LOSKUTOFF, N. M.; ANDERSON, G. B. The limitation of conventional breeding programs and the need and promise of assisted reproduction in non-domestic species. **Theriogenology**, v. 41, p. 119-132, 1994.
- 4 BAINBRIDGE, D. R. J.; JABBOUR, H. N. Potencial de assisted breeding techniques for the conservation of endangered mammalian species in captivity: a review. **Veterinary Record**, v. 143, n. 6p, p. 159-168, 1998.
- 5 IUCN/SPECIES SURVIVAL COMMISSION/CAT SPECIALIST GROUP/CONSERVATION BREEDING SPECIALIST GROUP. **South American felid conservation assessment and management plan**. Giand: IUCN, 2002. 99 p.
- 6 FUNDAÇÃO BIODIVERSITAS – LISTA DAS ESPÉCIES AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO DA FAUNA BRASILEIRA. Disponível em: (<http://www.biodiversitas.com.br>). Acesso em: maio 2003.
- 7 MORATO, R. G. **Reprodução assistida como ferramenta auxiliar no manejo e conservação da onça pintada (*Panthera onca* LINNAEUS, 1758)**. 2001. 127 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- 8 WILDT, D. E. et al. Reproductive physiology of the

- clouded Leopard. I. Electroejaculates contain high level of pleiomorphic spermatozoa throughout the year. **Biology of Reproduction**, v. 34, n. 5, p. 937-947, 1986.
- 9 BROWN, J. L. et al. Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured noninvasively in feces. **Biology of Reproduction**, v. 51, n. 4, p. 776-786, 1994.
- 10 BROWN, J. L. et al. Reproductive activity in captive female cheetahs (*Acinonyx jubatus*) assessed by faecal steroids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 106, p. 337-346, 1996.
- 11 GRAHAM, L.H.; BROWN, J.L. Cortisol metabolism in the domestic cat and implications for non-invasive monitoring of adrenocortical function in endangered felids. **Zoo Biology**, v. 15, n. 1, p. 71-82, 1996.
- 12 LASLEY, B. L.; KIRKPATRICK, J. F. Monitoring ovarian function in captive and free ranging wildlife by means of urinary and fecal steroids. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 22, n. 1, p. 23-31, 1991.
- 13 BROWN, J. L.; WILDT, D. E. Assessing reproductive status in wild felids by non-invasive faecal steroid monitoring. **International Zoo Yearbook**, v. 35, p. 173-191, 1997.
- 14 BROWN, J. L. et al. Understanding the basic reproductive biology of wild felids by monitoring of fecal steroids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 57, p. 71-82, 2001. Supplement.
- 15 CZEKALA, N. M. et al. Fecal steroid hormone analysis as an indicator of reproductive function in the cheetah. **Zoo Biology**, v. 13, n. 2, p. 119-128, 1994.
- 16 GRAHAM, L. H. et al. Non-invasive monitoring of ovarian function in several felid species by measurement of fecal estradiol-17 β and progesterins. **Zoo Biology**, v. 14, n. 3, p. 223-237, 1995.
- 17 MORAIS, R. N. et al. Testicular and ovarian function in South American felids assessed by fecal steroids. In: AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS ANNUAL MEETING, 1996. Puerto Vallarta. **Proceedings..** p. 561-565.
- 18 BROWN, J. L.; TERIO, K. A.; GRAHAM, L. H. Fecal androgen metabolite analysis for non invasive monitoring of testicular steroidogenic activity in felids. **Zoo Biology**, v. 15, n. 4, p. 425-434, 1996.
- 19 MORAIS, R. N. et al. 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, n. 8, p. 2027-2041, 2002.
- 20 MORAIS, R. N. et al. Adrenal activity assessed by fecal corticoids and male reproductive traits in three south American felid species. In: AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS ANNUAL MEETING, 1997, Houston, **Proceedings..** p. 220-223.
- 21 DARBRE, P. et al. Effect of estradiol on human breast cancer cells in culture. **Cancer Research**, v. 43, n. 1, p. 349-354, 1983.
- 22 REDDEL, R. R.; MURPHY, L. C.; SUTHERLAND, R. L. Factors affecting the sensitivity of T-47D human breast cancer cell to tamoxifen. **Cancer Research**, v. 44, n. 6, p. 2398-2405, 1984.
- 23 GRAHAM, L. H. **Non invasive monitoring of reproductive hormones in zoo and wildlife species.** JABOTICABAL: UNESP, 2001. Apostila curso.
- 24 SIEGEL, S. **Estatística não paramétrica.** São Paulo: McGraw-Hill, 1975. 350 p.
- 25 SHILLE, V. M. et al. Determination of reproductive status in the serval and bobcat using a validated, direct radioimmunoassay of fecal estradiol. **Biology of Reproduction**, v. 44, Abstract, 121, 1991. Supplement.
- 26 MOREIRA, N. et al. Reproductive steroid hormones and ovarian activity in felids of the Leopardus genus. **Zoo Biology** v. 20, n. 2, p. 103-116, 2001.
- 27 MATSUMURO, M. et al. A two-step extraction method to measure fecal steroid hormones in female cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). **American Journal of Primatology**, v. 48, n. 4, p. 291-298, 1999.
- 28 GROSS, T. S.; RODDEN, M. Fecal steroid analyses as an assessment of reproductive function in the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). **Proceedings of American Association of Zoo Veterinarians**, p. 387-389, 1991.