

CLAUDIA VERONICA CALAMARI

Avaliação das concentrações de testosterona no pêlo de
cães domésticos (*Canis lupus familiaris*)

São Paulo

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

CLAUDIA VERONICA CALAMARI

**Avaliação das concentrações de testosterona no pêlo de cães
domésticos (*Canis lupus familiaris*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira

São Paulo

2008

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2033
FMVZ

Calamari, Claudia Veronica

Avaliação das concentrações de testosterona no pêlo de cães domésticos (*Canis lupus familiaris*) / Claudia Veronica Calamari. – São Paulo : C. V. Calamari, 2008.
92 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2008.

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

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira.

1. Testosterona. 2. Pêlos. 3. Cães. 4. Extração hormonal. 5. Metanol.
I. Título.

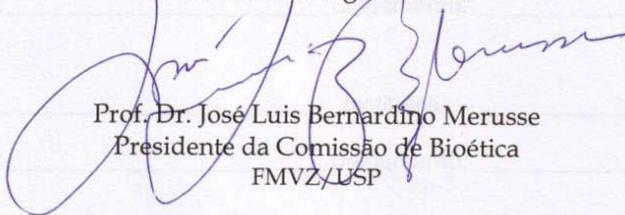


CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação das concentrações de testosterona no pêlo de cães domésticos (*Canis lupus familiaris*)", protocolado sob o nº1063/2007, utilizando 55 (cinquenta e cinco) cães, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 23/05/07.

(We certify that the Research "Evaluation of testosterone concentration in domestic dogs hair (*Canis lupus familiaris*)", protocol number 1063/2007, utilizing 55 (fifty five) dogs, under the responsibility Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 05/23/2007).

São Paulo, 13 de agosto de 2008



Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: CALAMARI, Claudia Veronica

Título: Avaliação das concentrações de testosterona no pêlo de cães domésticos
(*Canis lupus familiaris*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

À toda minha família,

Aos meus pais Jaime e Terezinha,

pelo apoio nas horas mais difíceis, pelo auxílio financeiro, por ficarem com o Rodrigo para eu concluir este trabalho, por todas as minhas conquistas. Devo quem sou e o que sou à vocês.

Aos meus irmãos e cunhadas César e Roberta, Cleber e Renata,

pelo incentivo e apoio, vocês são mais que família são meus grandes amigos.

Às minhas queridas sobrinhas e sobrinhos: Duda, Malu, Déborah, Carol, Arthur e Ângelo

grandes inspirações para a vida.

Ao meu querido marido Cristiano, que não é Guerreiro só no nome,

pelo amor, carinho, dedicação, compreensão e companheirismo de todas as horas.

À “coisinha” mais pura e bela que Deus me deu,

meu amado filho Rodrigo,

pois mesmo sem entender nada dessa vida maluca me permitiu concluir este trabalho com toda sua inocência.

Amo muito todos vocês !!!

Agradecimentos

Ao **Departamento de Reprodução Animal** (VRA) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de aperfeiçoamento nesta área que tanto me fascina.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira**, por me aceitar sob sua orientação e pela confiança em mim depositada para realização deste trabalho. Muito obrigada pelos ensinamentos, dedicação e paciência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), pela bolsa de doutorado.

Aos grandes amigos que encontrei no Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH) e que como só uma família pode ser: **Priscila Viau Furtado, Debora Cattaruzzi Rodini Guisso, Rodrigo Amaral, Marie Odile Chelini, Lílian Rangel de Castilhos, Flaviana Guião Leite, Alexandre Bastos Fernandes Lima, Renata Romano e Tatiana Kugelmeier**, devo muito deste trabalho à vocês que sempre estiveram dispostos a me ajudar com sugestões e críticas construtivas. E a **Lilian**, recém chegada a esta família, mas sempre com sorriso e entusiasmo pelo meu trabalho.

Agradecimento especial a **Priscila Viau Furtado** por estar sempre disposta a realizar minhas dosagens com muita competência, mesmo quando não existem mais tubos.

Ao grande amigo **Prof. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães**, por sua dedicação exemplar ao trabalho e pela oportunidade participar no programa de aperfeiçoamento de sua disciplina da graduação.

Às estagiárias do LDH **Monicque e Clarissa** pela ajuda nas dosagens.

Ao amigo **Marcílio Nichi**, pelo incondicional e precioso auxílio na estatística.

À veterinária **Maria del Rocio Nadal** proprietária do Canil Shambala por gentilmente ceder seus adoráveis animais: **Paco, Picachu, Picasso, Pepe, Caster, Trapito, Coffee, Bambino, Cigano, Ruanilho, Conan e Bingo.**

À **Luciana e Álvaro** que com muita dedicação viabilizaram a coleta de material nos grandes animais de sua propriedade, Canil Show Dog's e de seus amigos: **Ice, Speed, Rower, Speed, Theodore, Stephano, Snow, Snoopy e Mike.**

À querida amiga veterinária **Valéria de Oliveira Corvello**, pelo incentivo e apoio na colheita de pêlos de nossos amigos: **Dodô, Lupi, Coty e Yumi.**

À amiga veterinária **Míriam Sanda**, pelo auxílio na colheita de: **Bisteca, Pitu, Babi, Pretinha, Meg e Beethoven** (o começo de tudo).

Às secretárias do VRA **Alice, Thais e Harumi**, sempre dispostas a ajudar com um sorriso carinhoso.

Ao **Miguel** pela recepção matinal que incentiva qualquer desanimado.

À querida **Dona Silvia**, por seu sorriso e todos os cafés que como ela ninguém saber fazer.

À **Elza Faquim**, pela correção bibliográfica.

À **Nossa Senhora Aparecida**, que esteve sempre comigo todos os momentos difíceis não permitindo que eu fraquejasse.

À todos que de alguma forma contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

*"Se você encontrar um caminho sem obstáculos,
provavelmente não levará a lugar nenhum."*

Frank Clark

RESUMO

CALAMARI, C. V. **Avaliação das concentrações de testosterona no pêlo de cães domésticos (*Canis lupus familiaris*)**. [Evaluation of testosterone concentrations in domestic dogs hair (*Canis lupus familiaris*)]. 2008. 92 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

O objetivo do presente estudo foi determinar as concentrações de testosterona no pêlo de cães domésticos, testar dois protocolos diferentes de extração hormonal, comparar os níveis séricos e avaliar as possíveis diferenças de concentração de testosterona no pêlo de acordo com: o sexo; animais castrados e inteiros; região de colheita; tipo e tempo de armazenamento do extrato e coloração da pelagem. Foram utilizados 31 animais adultos, sendo 25 machos e 6 fêmeas, da raça poodle provenientes de canis particulares. O pêlo foi colhido com auxílio de tesoura ou máquina de tosa e armazenados em temperatura ambiente, juntamente com colheita da amostra de sangue. Os protocolos de extração utilizaram 3mL de metanol como solvente por 2 ou 48 horas, os extratos foram secos em ar comprimido, ressuspendidos e armazenados na geladeira ou freezer por até 30 dias. As concentrações foram determinadas por radioimunensaio (RIE). Os testes estatísticos foram realizados utilizando-se o programa computadorizado Statistical Analysis System (SAS). Os resultados mostraram que é possível determinar as concentrações do hormônio testosterona no pêlo de cães. Os dois protocolos de extração de testosterona no pêlo demonstraram-se eficientes, porém o segundo apresenta maior recuperação hormonal do que o primeiro. É possível determinar as concentrações do hormônio testosterona no pêlo de cães. Não há correlação positiva entre os níveis hormonais de testosterona encontrados no sangue e no pêlo. Há diferença estatística significativa entre as concentrações de testosterona no pêlo de acordo com o sexo: entre fêmeas e machos inteiros ($p=0,0074$) e entre fêmeas e machos (castrados e inteiros) ($p=0,0042$). Não há diferença entre fêmeas e machos castrados ($p=0,3610$). Não há diferença significativa das concentrações de testosterona no pêlo entre animais machos inteiros ou castrados. Não há diferença estatística significativa das concentrações de testosterona no pêlo entre as regiões de colheita da amostra (cabeça, corpo ou membros), pois em todos os animais há correlação positiva entre essas áreas. Não há diferença significativa das

concentrações de testosterona no pêlo de acordo com a coloração da pelagem (branca, cinza, marrom e preta). Não há diferença estatística significativa das concentrações de testosterona no armazenamento do extrato do pêlo ressuspendido por até 30 dias na geladeira ou freezer.

Palavras-chave: Testosterona. Pêlos. Cães. Extração hormonal. Metanol.

ABSTRACT

CALAMARI, C. V. **Evaluation of testosterone concentrations in domestic dogs hair (*Canis lupus familiaris*)**. [Avaliação das concentrações de testosterona no pêlo de cães domésticos (*Canis lupus familiaris*)]. 2008. 92 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

The objective of the present study was to determine the concentrations of testosterone in domestic dogs hair, to test two different protocols of hormonal extraction, to compare the levels and in accordance with to evaluate the possible differences of hair concentration of testosterone: the sex; castrated and intact animals; sampling areas; type and time of storage of the extract and hair color. 31 adult animals had been used, being 25 males and 6 females, of the poodle breeds proceeding from particular kennels. The hair was cut with of scissors help or machine and keep in ambient temperature, together with of the sample of blood. The extraction protocols added 3mL of methanol as solvent for 2 or 48 hours, the extracts were dried in compressed air, added in assay buffer and stored in the refrigerator or to freezer for up to 30 days. The concentrations had been determined by radioimmunoassay (RIA). The statistical tests were performed using the computer program Statistical Analysis System (SAS). The results had shown that it is possible to determine the concentrations of testosterone in dogs hair. The two protocols of extraction of testosterone in the hair had been demonstrated efficient, however as it presents greater hormonal recovery of what the first one. The sex has difference significant statistics in accordance with testosterone concentrations in the hair: between females and intact males ($p=0,0074$) and between females and males (castrated and intact) ($p=0,0042$). It does not have difference between females and castrated males ($p=0,3610$). It does not have significant difference of the concentrations of testosterone in the hair between intact or castrated male. It does not have difference significant statistics of the concentrations of testosterone in the hair in the sampling areas (head, body or members), therefore has positive correlation between these areas. The hair color does not have significant difference with concentrations of testosterone in the coat (white, gray, brown and black). It does not have difference significant statistics of the concentrations of testosterone in the

storage of the extract added in assay buffer for up to 30 days in the refrigerator or freezer.

Key words: Testosterone. Hair. Dogs. Hormonal extraction. Methanol.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	Hormônio Testosterona: aspectos estruturais e fisiológicos.....	20
2.2	Monitoramento endócrino não invasivo	24
2.3	Matriz biológica: pêlo.....	26
2.4	Extração hormonal no pêlo.....	29
3	OBJETIVOS.....	35
4	MATERIAL E MÉTODO.....	37
4.1	Animais.....	38
4.2	Colheita e armazenamento das amostras.....	38
4.2.1	Pêlos.....	38
4.2.2	Sangue.....	39
4.3	Técnicas de extração hormonal no pêlo.....	39
4.3.1	Protocolo 1 (YANG et al., 1998).....	39
4.3.2	Protocolo 2 (YANG et al., 1998 e BAUMGARTNER et al., 1979 – modificados).....	41
4.4	Armazenamento do extrato.....	44
4.5	Quantificação hormonal.....	44
4.6	Análise Estatística.....	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
5.1	Parâmetros de qualidade dos ensaios hormonais.....	49
5.2	Concentração de Testosterona (T) no pêlo utilizando os protocolos de extração 1 e 2.....	49
5.3	Concentração de testosterona nos extratos ressuspensos e conservados em geladeira ou freezer após a extração.....	52
5.4	Concentração de testosterona no sangue e no pêlo.....	55

5.5	Concentração de testosterona no pêlo de acordo com as regiões de colheita.....	57
5.6	Concentração de testosterona no pêlo e no sangue de acordo com a coloração da pelagem.....	59
5.7	Concentração de testosterona no pêlo e no sangue de machos e fêmeas.....	61
5.8	Considerações finais.....	66
6	CONCLUSÕES.....	67
	REFERÊNCIAS.....	70
	ANEXOS.....	77

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Na última década a crescente preocupação com a conservação de animais silvestres, levou ao desenvolvimento de inúmeras metodologias alternativas (ACCORSI et al., 2008).

As técnicas não invasivas de monitoramento endócrino auxiliam o conhecimento da fisiologia reprodutiva e a aplicação de biotecnologias em programas de conservação de espécies ameaçadas de extinção (GOODROWE; CHAKRABORTY; WILDT, 1985).

Utilizadas em diversas espécies, as técnicas de monitoramento não invasivo consistem na extração de hormônios e seus metabólitos de diferentes matrizes biológicas como: fezes, urina, leite, saliva e pêlos (KOREN et al., 2002).

Atualmente a análise do pêlo tem sido empregada em diversas áreas entre elas: para identificação de animais expostos a metais pesados (POZEBON; DRESSLER; CURTIUS, 1999); determinação de esteróides sintéticos usados na produção de gado de corte (DURANT et al., 2002) e principalmente para identificação do uso ilegal de drogas anabolizantes por atletas (KINTZ, 1998; WHEELER et al., 1998; KINTZ et al., 1999).

A escolha do pêlo como matriz biológica apresenta vantagens como: alta disponibilidade, fácil armazenamento e transporte (YANG et al., 1998), a coleta não envolve dor ou possíveis infecções e a análise da amostra não é afetada pelo estresse da captura (KOREN et al., 2002). Condições estressantes podem elevar as concentrações plasmáticas de cortisol, podendo causar alteração dos resultados hormonais obtidos (COOK; HARRIS; INGRAM, 2000) já que a

elevação de glicocorticóides na corrente sangüínea pode ocorrer em minutos (ACCORSI et al., 2008).

Embora a reposição do pêlo não seja na mesma velocidade que outras matrizes biológicas como sangue e urina, sua análise proporciona valioso complemento e método prático para determinação de eventos ocorridos no passado (BAUMGARTNER et al., 1979) como monitoramento do estresse crônico (DAVENPORT et al., 2006).

Dessa forma, a implantação e validação de novas técnicas de extração hormonal não invasivas são necessárias como métodos auxiliares no monitoramento reprodutivo e convívio social de espécies silvestres.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura está subdividida da seguinte forma: (2.1) Hormônio testosterona: aspectos estruturais e fisiológicos; (2.2) Monitoramento endócrino não invasivo; (2.3) matriz biológica: pêlo e (2.4) extração hormonal no pêlo.

2.1 Hormônio Testosterona: aspectos estruturais e fisiológicos

O hormônio testosterona (Figura 1) é um esteróide andrógeno que possui 19 carbonos e uma massa molecular de 288,41 daltons, apresentando uma ligação insaturada entre os carbonos C4 e C5, um ceto grupo no C3 e um grupo hidroxila no carbono C17 (NORMAN; LITWACK, 1997).

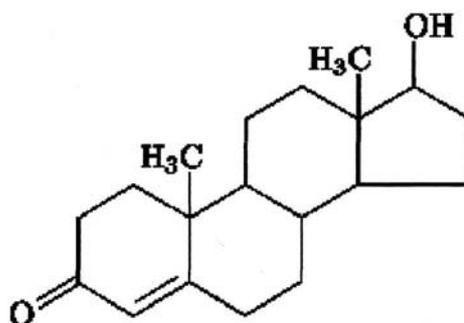


Figura 1 – Molécula da Testosterona

Nos machos, a testosterona é produzida e secretada pelas células de Leydig testiculares e no córtex da adrenal (PFAFF; PHILLIPS; RUBIN, 2004). Já nas fêmeas, quantidades pequenas são produzidas nas células da teca, nas adrenais e

no tecido periférico através da conversão da androstenediona e de desidroepiandrosterona em testosterona (NORMAN; LITWACK, 1997).

De acordo com Norman e Litwack (1997) assim como outros andrógenos, a testosterona possui como precursor o colesterol e pode estar presente na circulação periférica de 3 formas:

- livre ou não-ligada, forma biologicamente ativa;
- fracamente ligada à albumina, podendo tornar-se ativa após rápida dissociação da albumina e;
- fortemente ligada às globulinas ligadoras dos hormônios sexuais (SHBG – *sex hormone binding globulin*), presente na maior parte da testosterona de fêmeas adultas e sensível às taxas de estrógenos circulantes.

Antes da puberdade, as concentrações de SHBG são muito semelhantes nos machos e nas fêmeas, ocorrendo acentuada diminuição desta proteína em ambos os sexos para assegurar maior quantidade de testosterona e 17 β -estradiol pós-puberdade (LITWACK; SCHMIDT, 1998).

Nos testículos, os andrógenos estão ligados à Proteína de Ligação a Andrógeno (ABP – *androgen binding protein*) produzida nas células de Sertoli, sendo esta proteína responsável pelas altas concentrações de testosterona necessárias para produção de espermatozóides nos túbulos (LITWACK; SCHMIDT, 1998).

De acordo com Kandel, Schwartz e Jessel (2000), o sistema reprodutivo é originalmente feminino, sendo possível sua masculinização mediante a ação dos andrógenos, pois as altas concentrações de testosterona induzem o desenvolvimento dos dutos de Wolff, resultando na formação de epidídimos, canais deferentes e vesículas seminais.

A testosterona possui 2 metabólitos (Figura 2) importantes, sendo convertida pela 5 α -redutase em dihidrotestosterona (nos machos) e em 17 β -estradiol (nas fêmeas) pela aromatase (PFAFF; PHILLIPS; RUBIN, 2004).

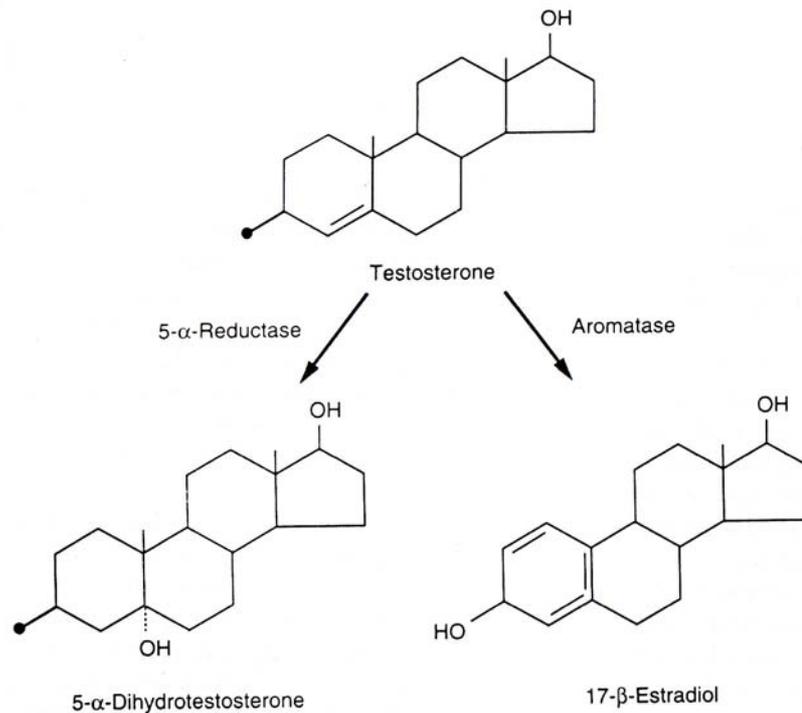


Figura 2 – Conversão da Testosterona em 5- α -dihidrotestosterona e 17 β -estradiol

Além de ser responsável pelo desenvolvimento de glândulas sexuais acessórias, estimulação da espermatogênese e características sexuais secundárias, a testosterona tem importante papel nos comportamentos: sexual (libido) (HAFEZ; HAFEZ, 2004), dominância e agressão (DELVILLE; MANSOUR; FERRIS, 1996; KANDEL; SCHWARTZ; JESSEL, 2000; SIMPSON, 2001; BARRET et al., 2002; GIAMMANCO et al., 2005; MEHTA; JOSEPHS, 2006; GOULD; ZIEGLER, 2007; SHARGAL et al., 2008)

O sinal fisiológico que desencadeia a motivação sexual (libido) ocorre através secreção de hormônios esteróides na circulação sangüínea, sendo andrógenos para os machos e estrógenos para as fêmeas. Após serem liberados na corrente sangüínea, estes hormônios se ligam a receptores no Sistema Nervoso Central (SNC), iniciando uma série de eventos comportamentais como: incitação sexual, corte, ereção, exposição peniana, intromissão e ejaculação (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Giammanco et al. (2005) referem que receptores para testosterona estão localizados em diversas áreas do cérebro. A testosterona age no SNC após aromatização em estrógeno e durante o período embrionário é de suma importância para desenvolvimento da agressividade no adulto. A presença de testosterona no período pré-natal afeta a distribuição de fibras serotoninérgicas no cérebro. A testosterona aumenta os níveis de vasopressina ou ADH (hormônio antidiurético) na amígdala medial, hipotálamo lateral e área pré-óptica medial, envolvidos no comportamento agressivo. A ação da testosterona no SNC está relacionada com a redução dos níveis de serotonina e aumento da atividade da vasopressina. De acordo com Delville, Mansour e Ferris (1996) a testosterona facilita o aparecimento da agressão através da ativação de receptores de vasopressina no hipotálamo.

De acordo com Wingfield et al. (1990) a testosterona e o comportamento agressivo estão relacionados à reprodução, no estabelecimento e manutenção territorial, na disputa e proteção da fêmea e disputa hierárquica, porém a elevação de seus níveis por si só, não ativam a agressão.

Segundo Giammanco et al. (2005) a agressividade é um comportamento comum em todas as espécies, sendo em geral machos mais agressivos do que fêmeas.

Nos cães, a organização social ocorre por dominação masculina e a agressão está ligada à dominação e territorialidade. Em cães de raças consideradas agressivas e não agressivas, não houve diferença entre as concentrações séricas de testosterona, sendo necessário considerar a interferência ambiental como um fator importante no comportamento agressivo desta espécie (CASTILHOS, 2006).

Em hyrax (*Procavia capensis*) as fêmeas são dominantes e apresentam níveis de testosterona maiores do que nos machos. Já as hienas (*Crocuta crocuta*) e nos lêmures (*Lemur catta*) as fêmeas também são dominantes, controlam as interações sociais porém apresentam concentrações de testosterona menores que nos machos da mesma espécie (KOREN et al., 2006).

Em algumas espécies outros hormônios andrógenos como a androstenediona e a dihidrotestosterona podem estar envolvidos com a agressividade (DLONIAK et al., 2004).

2.2 Monitoramento endócrino não invasivo

Na visão conservacionista de canídeos não domésticos, as técnicas de monitoramento endócrino não invasivas podem ampliar o conhecimento dos mecanismos fisiológicos reprodutivos, bem como a aplicação de biotecnologia nas populações cativas, eliminando as alterações nos níveis hormonais decorrentes do estresse momentâneo da captura (BROWN et al., 2001; SILVA, 2005;).

A mensuração da concentração de esteróides livres circulantes é considerada a forma mais acurada na obtenção do reflexo da função gonadal, e exige colheitas seriada de amostras sangüíneas. No entanto, nos animais selvagens, as freqüentes

contenções físicas e químicas necessárias para a colheita de sangue, ocasionam estresse severo ao animal (HÖLD et al., 1998). O estresse pode provocar aumento das concentrações plasmáticas de cortisol através de sua ação sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HÖLD et al., 1998; DAVENPORT et al., 2006; ACCORSI et al., 2008).

A preocupação com a qualidade de vida de animais cativos, estimulou o desenvolvimento de técnicas de monitoramento não-invasivas da função adrenal (ACCORSI et al. 2008).

No Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH-USP), diversos animais como *Panthera onca* (VIAU, 2003), *Alouatta caraya* (KUGELMEIER, 2005), *Capra hircus* (CAPEZZUTO, 2005), *Canis lupus familiaris* (SILVA, 2005) antropóides não-humanos (PIZZUTTO, 2006), *Leopardus pardalis* (PAZ et al., 2007), *Callithrix penicillata* (SGAI, 2007), *Trichechus inunguis* (AMARAL, 2008) tiveram resultados satisfatórios com a extração hormonal não invasiva utilizando fezes, urina e saliva como matrizes biológicas.

Lemle (2006) sugere em sua pesquisa que cães domésticos servem como modelo experimental para canídeos em extinção como o lobo-guará. Segundo o IBAMA (2003) e a IUCN (2007), dentro da família *Canidae*, o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), o cachorro vinagre (*Speothos venaticus*) encontra-se ameaçados de extinção, e o cachorro do mato de orelha curta (*Atelocynus microtis*) não possui estudos suficientes para sua classificação. De acordo com Novais (2003) a semelhança antigênica encontrada para os antígenos de grupo sanguíneo de cães domésticos, lobos-guará e cachorros-do-mato aproxima estas espécies, sugerindo que tenham evoluído a partir de um ancestral comum. Apesar de espécies de uma mesma família apresentar diferenças reprodutivas, tecnologias que aumentem o

sucesso reprodutivo no cão doméstico poderão ser utilizadas para canídeos selvagens em vias de extinção (WILDT et al., 1995).

2.3 Matriz biológica: pêlo

A pele é um órgão complexo com diferentes funções como: defesa, termorregulação, percepção, proteção, síntese da vitamina D entre outras. Apresenta três camadas: epiderme, derme e subcutâneo. A epiderme é constituída de epitélio estratificado e nela está inserida o folículo piloso e as glândulas apócrina e sebácea que se projetam para dentro da derme. A derme é constituída de tecido conjuntivo possui vasos sangüíneos, linfáticos e nervos, e está localizada entre a epiderme e o subcutâneo. O subcutâneo é constituído de tecido adiposo, nervos e vasos sangüíneos (NESBITT; LOWELL, 1998).

A pele dos cães está recoberta por pêlos exceto focinho, coxins plantares e junções mucocutâneas (SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 2001).

O pêlo é praticamente proteína sólida (queratina) embora cada um cresça apenas 0,04 à 0,18mm por dia, quando centenas de milhares de pêlos estão crescendo, serão produzidos até 18-21m diariamente (SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 2001).

Os pêlos são filamentos flexíveis, elásticos e corneificados, que crescem a partir de cavidades em forma de sacos chamados: folículos e apresentam uma fração livre (pedículo piloso) e uma fração proximal (raiz). A fração livre é uma estrutura inerte composta de três partes: córtex, cutícula e medula. O córtex é o principal componente do pêlo constituído de células queratinizadas firmemente

compactadas; a cutícula é uma delgada camada externa de células que se sobrepõem e a medula é a camada mais interna. A raiz pilosa tem extremidade oca e também pode ser chamada de bulbo piloso (POZEBON; DRESSLER; CURTIUS, 1999; SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 2001).

O padrão de crescimento dos pêlos varia de acordo com a espécie sendo determinado pelo tipo de atividade folicular podendo ser: (a) atividade contínua como na lã de ovinos e cabelo humano; (b) períodos de atividade e inatividade com pêlos em diferentes fases do ciclo e (c) período de atividade com todos os folículos na mesma fase. Para alguns autores os cães possuem os tipos “b” e “c” de padrão de crescimento (GUNARATNAM; WILKINSON, 1983).

Após a morfogênese os pêlos crescem ciclicamente em padrão de mosaico. Cada ciclo consiste de um período de crescimento (anagênese), quando o folículo está em franca produção do pêlo e de um período de repouso (telogênese), quando o pêlo fica retido no folículo (pêlo morto e que subsequente se perde) (DIAZ et al., 2004). Há também o período de transição entre os dois estágios chamado: catagênese (SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 2001).

O crescimento do pêlo é influenciado por fatores endógenos e exógenos e um mesmo animal pode apresentar regiões corpóreas com diferentes velocidades de crescimento (DIAZ et al., 2006). A ciclicidade do período de crescimento dos pêlos pode ser influenciada pela exposição à luz, doenças e condição hormonal (NESBITT; LOWELL, 1998). Dunnett e Lees (2003) afirmam que a glândula pineal através da secreção do hormônio melatonina e outros hormônios andrógenos, regulam o crescimento da pelagem.

Segundo a classificação de Scott, Miller e Griffin (2001) os pêlos podem ser divididos em normais (comprimento intermediário) curtos e longos.

A **pelagem normal** compõe-se de pêlos primários (pêlos protetores comuns e cerdas) e pêlos secundários (pelos finos ou subpêlos). São exemplos deste tipo: o Pastor Alemão, cães selvagens como lobos e coiotes).

A **pelagem curta** pode ser classificada como espessa ou fina. A espessa é típica do Rottweiler e muitos Terriers que apresentam intenso crescimento de pêlos primários onde os pêlos secundários são insignificantes. A pelagem curta fina é observada no Boxer, Daschund e Pinscher miniatura composta por maior número de pêlos por unidade de área, os secundários são numerosos e desenvolvidos e os primários tem dimensão reduzida.

A **pelagem longa** é dividida em dois grupos; cobertura longa de pêlos finos e a cobertura lanosa de pêlos espessos. A primeira é encontrada em Cocker Spaniel, Pomerânia, Chow Chow com mais peso por unidade de área que a pelagem normal, pois são mais finos. A segunda é vista no Poodle, Bedlington Terrier, com secundários compondo 70% do peso total e 80% do número total de pêlos. Os secundários são relativamente espessos e medulares (tipo lanugem) apresentam uma menor tendência em perder pêlos que a maioria de outras raças.

Segundo Diaz et al. (2004) ovinos, raças de cães como Poodle, Sheepdog e o cabelo do ser humano, predominam-se fios em fase anágena do ciclo capilar. Os cães da raça: Husky Siberiano, Yorkshire, Golden Retriever e Labrador apresentam a maior parte dos pêlos em fase telógena.

Acredita-se que a incorporação de substâncias no pêlo, como hormônios esteróides e metabólitos de drogas, ocorra através de difusão passiva a partir do suprimento sangüíneo da base do folículo piloso (GLEIXNER; MEYER, 1997; THIEME et al., 2003). As drogas podem ser incorporadas à fibra do pêlo durante o período de anagênese, fase em que a papila está em contato íntimo com vasos

sangüíneos (GLEIXNER; MEYER, 1997; POZEBON; DRESSLER; CURTIUS, 1999; DURANT et al., 2002; DAVENPORT et al., 2006).

2.4 Extração hormonal no pêlo

Os primeiros resultados da análise de cabelo foram determinados por Hoppe em 1858, que identificou arsênico no cabelo de cadáveres exumados 11 anos após seu sepultamento (SACHS, 1997). Em 1954, Goldblum extraiu anfetamina em pêlos de cobaias. Na década de 40, propõe-se que o cabelo poderia ser utilizado como material de biópsia para determinação de elementos traço, já que se tratava de um órgão excretor. Vale a pena ressaltar que nos anos 60, análise de amostras de cabelo de Napoleão Bonaparte elucidou sucessivas exposições ao ácido arsênico, supondo que o tirano tivesse sido envenenado. (POZEBON; DRESSLER; CURTIUS, 1999).

O pêlo já foi utilizado para a extração de DNA de humanos (LI et al., 2005), para rastrear drogas de abuso (SELAVKA; RIEDERS, 1995) e esteróides anabolizantes (MARCOS et al., 2004), na detecção dos hormônios reprodutivos (GLEIXNER; MEYER, 1997; YANG et al., 1998; WHEELER et al., 1998), em estudos de estresse para animais cativos (DAVENPORT et al., 2006; ACCORSI et al., 2008), como indicador de mudanças na dieta (CERLING et al., 2004; CERLING et al., 2006) e na detecção de glicocorticóides sintéticos de gado de corte (VAN DE HAUWE et al., 2005).

Segundo Pozebon, Dressler e Curtius (1999) o cabelo é considerado um dosímetro biológico, um filamento de registro ou espelho do ambiente onde o indivíduo foi exposto.

A análise hormonal através do pêlo oferece um perfil à longo prazo (semanas e meses), não sendo capaz de monitorar flutuações hormonais diárias (KOREN et al., 2002; ACCORSI et al., 2008). A detecção do uso de esteróides anabolizantes em bovinos de corte através de matrizes como urina, fezes e carne, podem ser insuficientes para a identificação destes hormônios, devido à rápida eliminação por estas vias (MARCOS et al., 2004).

Os fluídos corpóreos podem determinar o nível de drogas somente quando estas forem administradas 1 ou 2 dias antes da coleta da amostra. O sangue e a urina não refletem necessariamente com acurácia a concentração das drogas nos tecidos. Os cabelos retêm a evidência do uso de drogas, permitindo a detecção à longo prazo (BAUMGARTNER et al., 1979).

De acordo com Kintz (1998), em contraste com a urina, a análise do cabelo é uma janela de detecção de semanas a meses, dependendo do comprimento do cabelo e prova o padrão de utilização de drogas de abuso.

O pêlo oferece perfis endócrinos através da média da atividade hormonal do período estudado (ACCORSI et al., 2008).

Diversas metodologias foram utilizadas para a extração e dosagem de substâncias no pêlo e algumas recomendações foram feitas pela Society of Hair Testing para análise em casos forenses (SOCIETY OF HAIR TESTING, 2004).

Alguns solventes são recomendados como o metanol que tem capacidade de penetrar profundamente no pêlo, permitindo a extração de esteróides do interior do fio (DAVENPORT et al., 2006).

Em 1979, Baumgartner et al. determinaram a concentração de opiáceos no cabelo humano, através da extração com 5mL de metanol incubado por 2 horas e detecção por radioimunoensaio. Outros autores também utilizaram o metanol como solvente para extrair cortisol do pêlo de macacos rhesus incubando a matriz com o solvente por 24 horas (DAVENPORT et al., 2006).

Yang et al. (1998) utilizaram o solvente éter de petróleo e conjuntos diagnósticos da Siemens[®] para radioimunoensaio, para determinação de estradiol, progesterona e testosterona em cabelo de seres humanos.

Pereira et al. (2006) utilizaram o solvente etanol para extração hormonal de estradiol e progesterona no pêlo de gatos domésticos.

A testosterona extraída do cabelo de homens, mulheres adultas e crianças, através de uma solução de hidróxido de sódio e quantificada por radioimunoensaio, Cromatografia Gasosa ligada a Espectometria de Massa (GCMS) e Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC), elucidou diferenças entre os dois sexos. Não houve diferença significativa entre mulheres e crianças neste estudo (WHEELER et al., 1998).

A extração hormonal dos esteróides cortisol e testosterona através do pêlo foram utilizadas por Koren et al. (2002), com a finalidade de estabelecer dominância social em hyrax (*Procavia carpensis*). Anos mais tarde, Koren, Mokady e Geffen (2006), utilizaram o solvente metanol e kits de teste Elisa (Kit ALPCO Diagnostics, USA) para quantificar o hormônio testosterona em pêlos de *Hyrax sp.*

Davenport et al. (2006) desenvolveram e validaram técnica de mensuração de níveis de cortisol no pêlo de macacos rhesus e correlacionaram com os níveis do hormônio encontrados na saliva.

A determinação de concentrações de cortisol no pêlo e fezes de cães e gatos domésticos, através de modificação do protocolo de extração descrito por Koren et al. (2002) estabeleceu uma correlação positiva entre as duas matrizes biológicas (ACCORSI et al., 2008).

Yang et al. (1998) sugerem que a utilização de shampoos e diferentes segmentos do cabelo (base, meio e distal) não afetaram o nível de esteróides encontrados no cabelo, assim como relatado por Wheeler et al. (1998). Davenport et al. (2006) referem que os segmentos proximal e distal dos pêlos de macacos não diferem quanto à concentração de cortisol.

Baumgartner et al. (1979) referem que os procedimentos para lavagem e descontaminação externa para o cabelo não são necessárias, sendo os procedimentos de extração estabelecidos para o pêlo animal igualmente efetivo para o cabelo humano. Srogi (2006) utilizou repetidas lavagens com shampoos para o cabelo e também concluiu que o tratamento não tem ação efetiva sobre as drogas contidas na matriz. Embora os esteróides não sejam solúveis em água, a água penetra no cabelo mais do que substâncias alcoólicas, o que poderia fazer com que substâncias exógenas fossem incorporadas aos fios se estivessem diluídas em água (DAVENPORT et al., 2006).

Em 2006, Koren, Mokady e Geffen concluíram que os níveis de testosterona encontrados no pêlo estão significativamente correlacionados com os níveis séricos. Da mesma forma, Yang et al. (1998), detectaram níveis de estradiol, testosterona e progesterona em cabelo humano e correlacionaram positivamente aos níveis encontrados no soro.

A pigmentação pode ter um importante papel na incorporação de substâncias, devido à presença de melanina, responsável pela pigmentação dos pêlos (DURANT

et al., 2002). A melanina é um polímero formado nos melanócitos através da oxidação da tirosina (DUNNETT; LEES, 2003). Mecanismos de força eletrostática, interações hidrofóbicas e atração iônica podem ocorrer entre a melanina e uma substância (DURANT et al., 2002).

Dunnett e Lees (2003) sugerem que pêlos de coloração preta têm maior concentração de drogas do que os pêlos brancos, e os de coloração marrom possuem concentrações intermediárias. Nos estudos de Durant et al. (2002), não houve diferença estatística entre as colorações de pelagem preta, branca e marrom de bovinos.

Já Gleixner e Meyer (1997), mensuraram os níveis de estradiol e de testosterona em pêlos de bovinos de diferentes idades, sexo e coloração do pelame, utilizando etanol e quantificação por enzimaímmunoensaio. Observaram que os pêlos brancos de touros possuíam níveis hormonais de testosterona aproximadamente 4 vezes inferiores aos níveis encontrados nos pêlos de coloração preta. Nos bovinos castrados, os pêlos possuem níveis de estradiol (< 0,5 ng/g) e testosterona (3ng/g) inferior aos animais inteiros. Os autores sugerem que os níveis de testosterona encontrados no pêlo possam ser originários do córtex da glândula adrenal ou de pêlos que cresceram antes da castração destes animais. No plasma de touros encontrou-se concentrações de 100 a 1000 vezes maiores de testosterona (0,3-10 ng/mL) do que estradiol (4-30 pg/mL) e nos pêlos a testosterona manteve-se 15 vezes maior (15ng/g) quando comparado aos níveis de estradiol (1ng/g). Já nos novilhos não houve diferença entre os dois hormônios (3 pg/mL), pois as altas concentrações de estradiol podem ser originárias da placenta durante a prenhez.

Através da GCMS, Durant et al. (2002), quantificou 17α -etinilestradiol em pêlos de bovinos, 7 dias após sua aplicação. A mesma substância manteve-se em níveis detectáveis até o final do experimento (98 dias).

Gleixner e Meyer (1997) sugerem que a extração hormonal em pêlos poderia ser utilizada para animais de zoológico e animais de vida livre, quando amostras sanguíneas e urinárias não podem ser colhidas freqüentemente.

As informações obtidas através do cabelo podem ajudar no diagnóstico de drogas com efeito tóxico crônico, no monitoramento de trabalhadores expostos a produtos químicos perigosos e estudos de astronautas confinados em ambientes artificiais (BAUMGARTNER et al., 1979).

Accorsi et al. (2008) sugerem a aplicação da técnica de monitoramento não invasivo através da análise do pêlo em estresse crônico e monitoramento da função adrenal por longos períodos.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

- Determinar as concentrações do hormônio testosterona (T) no pêlo de cães.
- Avaliar dois diferentes protocolos de extração de testosterona no pêlo.
- Comparar os níveis hormonais de testosterona sérica com os níveis encontrados nos pêlos.
- Avaliar as possíveis diferenças de concentração de testosterona no pêlo de acordo com: o sexo; animais castrados e inteiros; região de colheita; tipo e tempo de armazenamento do extrato e coloração da pelagem.

MATERIAL E MÉTODO

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Animais

Foram utilizados 31 cães domésticos (*Canis lupus familiaris*) sendo 25 machos e 6 fêmeas da raça poodle, saudáveis, provenientes de canis particulares. Os animais foram agrupados da seguinte forma (Quadro 1):

Quadro 1 - Agrupamento dos animais

Animais	Machos	Fêmeas
Adulto branco	10	1
Adulto cinza	1	2
Adulto marrom	7	-
Adulto preto	3	1
Adulto castrado	4	2
Total	25	6

4.2 Colheita e armazenamento das amostras

4.2.1 Pêlos

Os pêlos foram colhidos de três regiões diferentes: cabeça, corpo e membros, com auxílio de máquina de tosa ou tesoura, acondicionados em sacos de papel

devidamente identificados e armazenados em temperatura ambiente até o momento da extração (Figura 3).



Figura 3 – Amostra de pêlo

4.2.2 Sangue

Aproximadamente 3mL de sangue foi colhido por punção da veia radial, no mesmo dia da colheita do pêlo no período da manhã. A amostra foi centrifugada a 1.500g durante 10 minutos e o soro obtido armazenado a -20°C até a dosagem hormonal por radioimunoensaio.

4.3 Técnicas de extração hormonal no pêlo

4.3.1 Protocolo 1 (YANG et al.,1998)

Neste protocolo avaliou-se a extração utilizando o solvente éter de petróleo. 50mg de pêlos cortados com o auxílio de uma tesoura em pequenos pedaços foram colocados em um tubo de ensaio e adicionados 2mL de solvente e agitado no vortex por 1 minuto (Figuras 4 e 5). Esta solução A ficou em descanso por 1 hora até que o líquido fosse extraído e transferido para outro tubo de ensaio. Foi adicionado novamente 1mL de solvente ao tubo de ensaio original que continha os pêlos e repetido o processo até que esta solução B fosse então extraída e combinada à solução A. As duas soluções foram homogeneizadas e secas em banho maria a 40°C. Os tubos secos foram ressuspensos com 0,2mL solução tampão gelatina.

Fórmula solução tampão gelatina: pH 7,0 [NaPO₄ (13,8g), NaCL (9,0g), azida sódica (1,0g), gelatina (1,0g) e água destilada (1000 mL)].

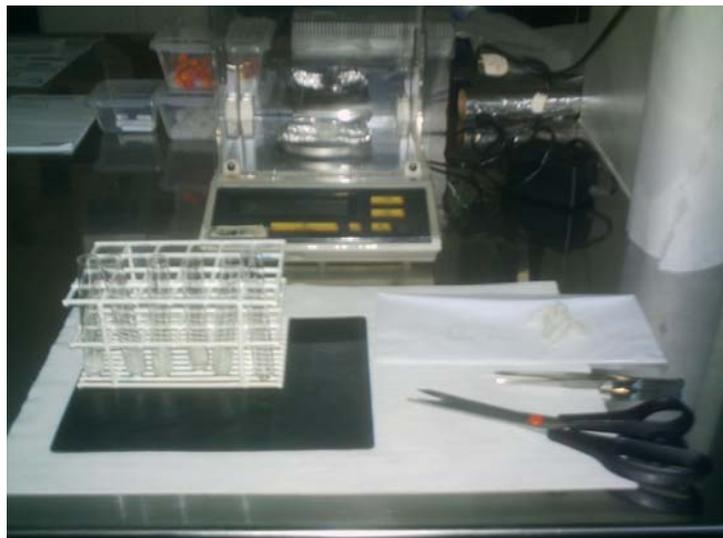


Figura 4 – Processamento da amostra: corte



Figura 5 - Processamento da amostra: pesagem

4.3.2 Protocolo 2 (BAUMGARTNER et al., 1979 e YANG et al., 1998 – modificados)

Baseado no experimento piloto e na literatura, julgou-se necessárias algumas modificações (serão explicadas em resultados e discussão) nas técnicas propostas por Baumgartner et al. (1979) e Yang et al. (1998) em relação ao tempo de extração e solvente utilizado.

Cerca de 50mg de pêlos cortados com o auxílio de uma tesoura em pequenos pedaços foram colocados em tubos de ensaio e adicionados 3mL do solvente metanol e agitados no vortex por 1 minuto (Figura 6). Estes tubos permaneceram em descanso na capela em temperatura ambiente por 48 horas, até que fossem agitados novamente no vortex por 1 minuto (Figura 7), e todo o seu componente líquido extraído com auxílio de uma pipeta para um tubo seco. Esta solução foi então seca em fluxo de ar comprimido em banho maria a uma temperatura de

aproximadamente 42°C (Figura 8). Os tubos secos foram ressuspensos com 0,5mL solução tampão gelatina e agitados no vortex 1 a 1 (Figura 9).



Figura 6 - Processamento da amostra: adição de metanol



Figura 7 – Processamento da amostra: vortex



Figura 8 – Processamento da amostra: secagem no fluxo sob ar comprimido



Figura 9 – Processamento da amostra: agitação no vortex

4.4 Armazenamento do extrato

Os extratos contendo 0,5 mL de solução ressuspensa foram divididos em 2 alíquotas de 0,25 mL cada, sendo uma alíquota armazenada na geladeira por 3 dias e outra no freezer também por 3 dias. As quantificações hormonais dos dois extratos foram realizadas no mesmo dia. Os extratos foram novamente armazenados e quantificados após 30 dias.

4.5 Quantificação hormonal

Para dosagem do hormônio testosterona e seus metabólitos foi utilizada a técnica de radioimunoensaio (RIE) em fase sólida, por meio de conjunto diagnóstico comercial (COAT-A-COUNT, Siemens, Los Angeles, CA, USA) desenvolvido para a avaliação quantitativa de testosterona no soro humano.

Os conjuntos diagnósticos utilizam como elemento traçador o hormônio marcado com ^{125}I e apresentam pouca reação cruzada com os metabólitos específicos para cada hormônio estudado. Todos os parâmetros de controle de qualidade dos ensaios hormonais foram analisados conforme rotina empregada no LDH.

Os percentuais de reações cruzadas do conjunto diagnóstico Siemens® para a testosterona encontram-se descritos no quadro 2.

Quadro 2 – Percentual de reações cruzadas comercial de radioimunoensaio para testosterona da marca Siemens®

Esteróide	% de reação cruzada
Testosterona	100%
5β-androstan-3α, 17β-diol	0,4%
Androstenediona	0,5%
5-androsten-3β, 17β-diol	0,2%
5α-dihydrotestosterona	2,8-3,4%
5(10)-Estren-17α-ethinyl-17βol-3-one	0,2%
4-estren-7α-methhyl-17β-ol-3-one	1,1%
4-estren-17-ol-3-one	20%
19-nortestosterona	20-22%
Ethisterona	0,7%
19-hydroxyandrostenediona	2%
11-ketotesterona	16%
Methiltesterona	1,7%
Norethindrona	0,1%
11β-hydroxyttestosterona	0,8-1,2%
Triamicinolona	0,2%

As concentrações de testosterona sérica e no pêlo determinadas pelo RIE foram expressas em ng/mL e ng/g respectivamente.

Para os extratos provenientes do pêlo, foi necessária a conversão para ng/g de pêlo, sendo os resultados obtidos pelo RIE transformados pela seguinte equação:

$$CF = \frac{C \times VF}{Pi}$$

Sendo:

CF = concentração final em ng/g de pêlo

C = concentração fornecida pelo RIE em ng/mL

VF = volume final da resuspensão mL

Pi = peso inicial a amostra em gramas

4.6 Análise Estatística

Os dados foram analisados através do programa SAS System for Windows (SAS, 2000).

Através do aplicativo Guided Data Analysis, as variáveis contínuas foram testadas quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. Caso não obedecessem a estas premissas, os dados foram transformados (logaritmo na base 10 - $\text{Log}_{10}X$; Raiz quadrada - RQ X; Quadrado - X^2) e se a normalidade não fosse obtida empregava-se então, o procedimento NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica (teste de Wilcoxon). A análise paramétrica foi realizada através do teste t de Student.

Para descrição dos resultados, foram empregados os erros padrões e as médias (média \pm erro padrão da média) dos dados originais e os níveis de significância (p) dos dados originais, quando obedecessem às premissas; dos dados transformados, quando necessária à transformação; e dos dados analisados através da análise não paramétrica, quando não obedecessem às premissas e não houvessem transformações possíveis.

O nível de significância utilizado para rejeitar H0 (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, considerou-se que ocorreram diferenças estatísticas entre as variáveis classificatórias para uma determinada variável resposta.

Em todas as comparações, com exceção da comparação entre machos inteiros vs. fêmeas nos pêlos (1/Raiz Quadrada) e da comparação entre machos castrados vs. fêmeas no pêlo, a variável resposta da concentração de testosterona tanto no sangue como nos pêlos obedeceram às premissas após a transformação para logaritmo na base 10. Nas comparações entre sangue vs. pêlos nos animais inteiros e machos castrados vs. fêmeas no sangue, além da transformação para logaritmo na base 10, foi necessária e a retirada de um outlier (animal Coty, que apresentou 0,02 ng/mL de testosterona e animal Bingo, que apresentou 0,58 ng/mL, respectivamente). Na comparação entre machos inteiros vs. fêmeas nos pêlos, foi necessária a transformação para 1/Raiz Quadrada. Já, para a comparação entre machos castrados vs. fêmeas no pêlo, a variável concentração de testosterona obedeceu às premissas sem a necessidade de transformações.

As variáveis respostas foram submetidas à análise de correlação de Pearson.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho serão apresentados e discutidos a seguir. Todos os experimentos executados no projeto piloto e ensaios que deram origem a esta tese foram anexados no final (Anexo A e B).

5.1 Parâmetros de qualidade dos ensaios hormonais

O controle de qualidade dos ensaios 1 e 2 (Anexo A) de RIE, foi realizado através da análise dos coeficientes de variação intra-ensaio, que foi inferior a 10% e 11% e inter-ensaio, inferior a 0,62% e 0,87% e a sensibilidade mínima detectada foi de 2,62ng/dL e 10ng/dL respectivamente. O ensaio 1 refere-se a toda dosagem dos machos e o ensaio 2 refere-se as amostras armazenadas por 30 dias, dosagem das fêmeas e protocolo 1.

5.2 Concentração de Testosterona (T) no pêlo utilizando os protocolos de extração 1 e 2

As concentrações de testosterona obtidas a partir dos protocolos 1 e 2 correlacionam-se entre si ($r=0,76$; $p>0,0009$) nas três regiões de colheita do pêlo (cabeça, corpo e membros), apesar do segundo protocolo recuperar uma quantidade de hormônio maior que o primeiro.

As concentrações médias (\pm EPM) de testosterona no pêlo de acordo com o protocolo 1 e 2 de extração foram expressos na tabela 1 e figura 10:

Tabela 1 – Comparação entre a concentração média \pm EPM (Mínimo-Máximo) de testosterona no pêlo (ng/g) de cães de acordo com a região corpórea, utilizando protocolo 1 e protocolo 2 de extração – São Paulo – 2008

Região	Protocolo 1	Protocolo 2	P
Cabeça	1,35 \pm 0,77 (0,10-3,37)	12,66 \pm 8,18 (0,26-44,37)	0,0870
Corpo	1,18 \pm 0,64 (0,10-3,53)	6,71 \pm 2,77 (0,26-15,03)	0,0998
Membros	1,01 \pm 0,56 (0,10-3,15)	12,07 \pm 5,82 (1,56-27,71)	0,0197
Três regiões	1,18 \pm 0,36	10,48 \pm 3,29	0,0004

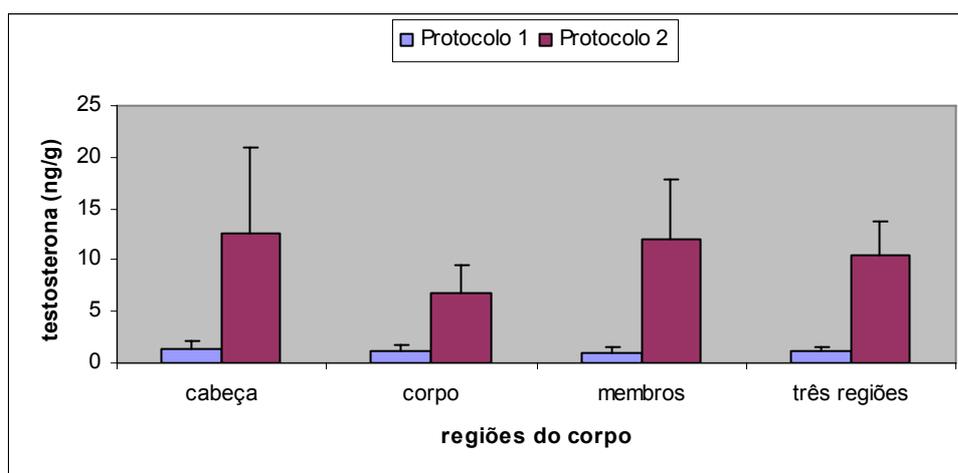


Figura 10 – Representação gráfica da comparação entre a concentração média (\pm EPM) de testosterona no pêlo (ng/g) de cães machos de acordo com a região de colheita e extração do protocolo 1 e 2 – São Paulo - 2008

Observou-se durante a execução do protocolo 1, que as amostras ressuspendidas com solução tampão gelatina e conservadas na geladeira por 3 dias até o momento da quantificação hormonal por RIE, mudaram de aspecto, tornando-se leitosas e de coloração marrom escura. Mesmo após a constatação desta

alteração, optou-se por quantificá-las e os resultados foram expressos na tabela 1. Durante a execução do protocolo 2, as amostras conservadas em geladeira e freezer por mais de 30 dias não tiveram nenhuma alteração quanto ao seu aspecto.

Após a execução de alguns experimentos no projeto piloto (Anexo B) avaliou-se algumas mudanças no protocolo descrito por Yang et al. (1998). O solvente éter foi substituído pelo metanol, solvente sugerido por outros autores (BAUMGARTNER, 1979; KOREN et al., 2002; MARCOS et al., 2004; VAN DE HAUWE et al., 2005; DAVENPORT et al., 2006; KOREN; MOKADY; GEFFEN, 2006; ACCORSI et al., 2008). O período de incubação do solvente com o pêlo foi testado no projeto piloto em: 2 horas (BAUMGARTNER, 1979; YANG et al., 1998; VAN DEN HAUWE et al., 2005); 24 horas (DAVENPORT et al., 2006) e 48 horas. Optou-se por utilizar 48 horas de incubação já que foram observados melhores resultados com este período. Yang et al. (1998) sugerem a adição do solvente à amostra em 2 etapas e Davenport et al. (2006) e Accorsi et al. (2008) descrevem a colocação de uma só vez, como foi utilizado no protocolo 2.

A quantidade adicionada de solução tampão para ressuspensão do extrato seco difere em alguns trabalhos. Yang et al. (1998) utilizou 0,2mL, Davenport et al. (2006) 0,4 mL e Accorsi et al. (2008) 0,6 mL. Após experimento no projeto piloto (Anexo B) preconizou-se a utilização de 0,5 mL de solução tampão ao invés de 0,2 mL, pois dessa forma obtinham-se melhores resultados com a lavagem do tubo com relação ao extrato seco aderido a parede do mesmo. O tubo foi colocado no vortex manualmente 1 a 1 até que toda a parede estivesse limpa.

A utilização do protocolo 2 ao invés do protocolo 1 está baseada nas seguintes observações:

- no protocolo 1 houve alteração do aspecto da amostra;

- o solvente utilizado no protocolo 1, éter, é mais volátil que o metanol (protocolo 2) o que muitas vezes dificulta a manipulação;
- o protocolo 2 é mais simples não requer muitas etapas e extrai uma quantidade maior de hormônio das amostras do que o protocolo 1.

5.3 Concentração de testosterona nos extratos ressuspensos e conservados em geladeira ou freezer após a extração

Após a determinação do uso do protocolo 2 comparou-se o armazenamento em geladeira e freezer dos extratos ressuspensos com 0,5 mL de solução tampão gelatina com a finalidade de identificar possíveis alterações de acordo com seu armazenamento, já que a maioria dos trabalhos não fazem referências sobre a conservação dos extratos até o momento da quantificação de hormonal (WHEELER et al., 1998; YANG et al., 1998; KOREN et al., 2002; VAN DEN HAUWE et al., 2005; DAVENPORT et al., 2006; KOREN; MOKADY; GEFFEN, 2006; ACCORSI et al., 2008).

Comparando os dois tipos de conservação do extrato ressuspensionado: geladeira ou freezer por 3 ou 30 dias, verificou-se que a concentração média (\pm EPM) de testosterona: geladeira por 3 dias ($8,30 \pm 3,03$ ng/g) vs freezer por 3 dias ($8,61 \pm 3,48$ ng/g, $n=15$, $p=0,5913$) e geladeira por 30 dias ($9,50 \pm 3,75$ ng/g) vs freezer por 30 dias ($10,46 \pm 4,08$ ng/g, $n=12$, $p=0,8821$), não houve diferença significativa entre a conservação do extrato ressuspensionado armazenado em geladeira ou freezer por 3 ou 30 dias (Tabela 2). Com a aplicação da Correlação de Pearson os dados apresentaram correlação extremamente significativa ($r=0,99$, $p<0,0001$).

Tabela 2 – Comparação da concentração média \pm EPM (Mínimo-Máximo) de testosterona no pêlo (ng/g) de cães machos de acordo com a sua conservação geladeira ou freezer por 3 ou 30 dias – São Paulo - 2008

Conservação	Geladeira	Freezer	P
3 dias	8,30 \pm 3,03 (0,26-44,37)	8,61 \pm 3,48 (0,26-49,53)	0,5913
30 dias	9,50 \pm 3,75 (1,00-44,31)	10,46 \pm 4,08 (1,00-48,74)	0,8821

As figuras 12 e 13 representam a concentração de testosterona no pêlo (ng/g) de machos de acordo com a conservação geladeira ou freezer por 3 e 30 dias respectivamente.

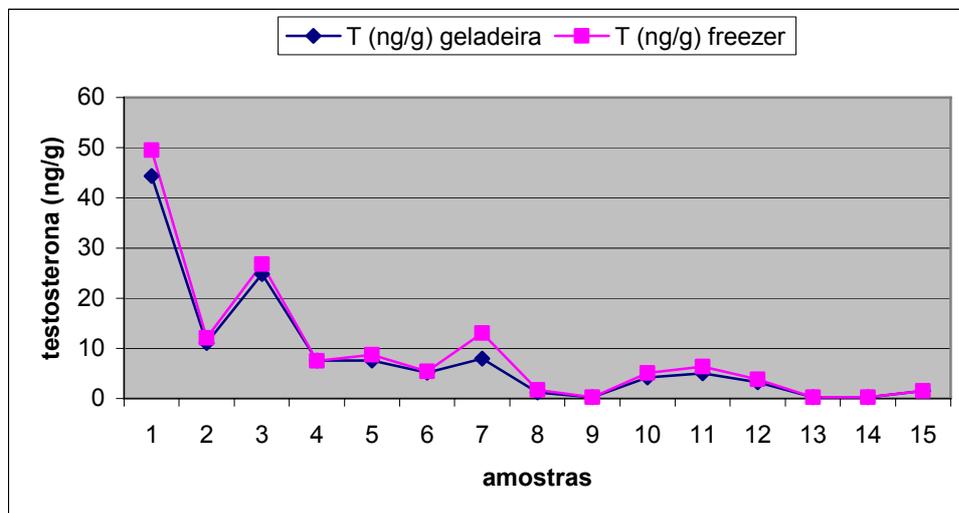


Figura 12 – Representação gráfica da concentração de testosterona no pêlo (ng/g) de cães machos de acordo com a conservação: geladeira ou freezer por 3 dias – São Paulo - 2008

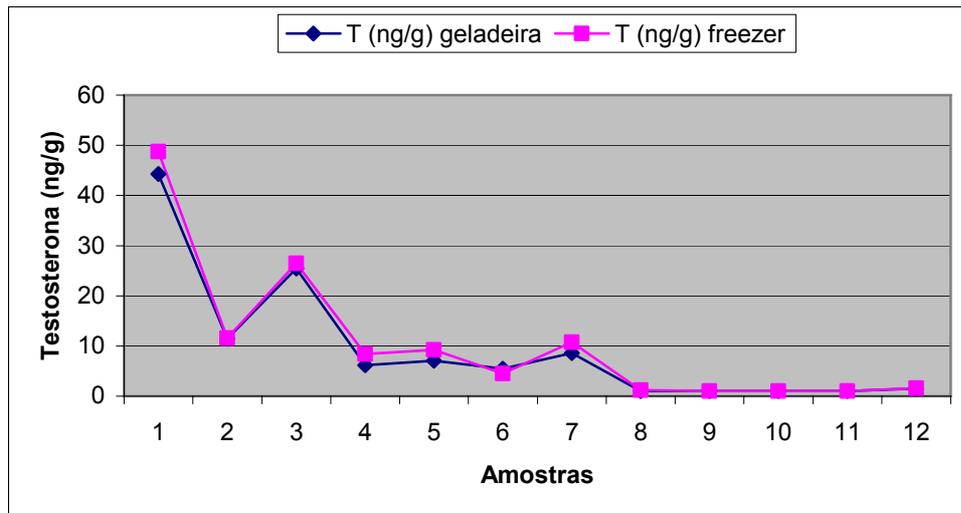


Figura 13 – Representação gráfica da concentração de testosterona no pêlo (ng/g) de cães machos de acordo com a conservação da amostra em geladeira e freezer 30 dias após a extração – São Paulo – 2008

A figura 14 evidencia a concentração média (\pm EPM) de testosterona no extrato de pêlo (ng/g) de cães machos ressuspendidos e conservados em geladeira e freezer por 3 ou 30 dias.

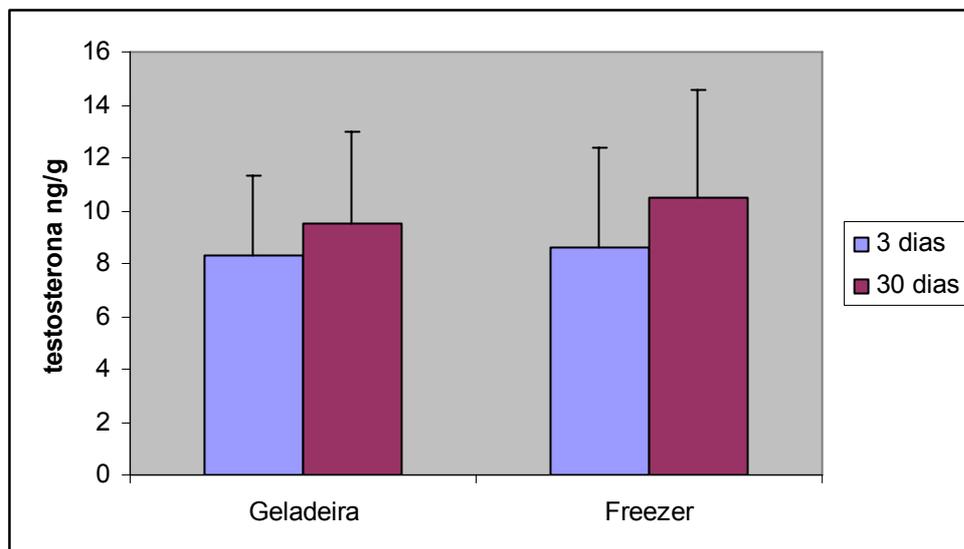


Figura 14 – Representação gráfica da comparação da concentração média (\pm EPM) de testosterona no extrato do pêlo (ng/g) de cães machos, conservados em geladeira e freezer por 3 e 30 dias – São Paulo - 2008

Como na literatura não há referências sobre a conservação do extrato ressuspendido com solução tampão, conclui-se através deste experimento que os tubos podem ser armazenados em geladeira ou freezer sem alterações significativas de acordo com o protocolo 2, por até 30 dias.

5.4 Concentrações de testosterona no sangue e no pêlo

Houve diferença significativa ($p < 0,0001$) entre a concentração de testosterona no sangue ($1,34 \pm 0,30 \text{ ng/mL}$) e no pêlo ($7,26 \pm 1,71 \text{ ng/g}$) de animais machos inteiros ($n=21$) houve diferença significativa ($p=0,0057$) entre a concentração de testosterona no sangue ($0,16 \pm 0,14 \text{ ng/mL}$) e no pêlo ($3,26 \pm 0,94 \text{ ng/g}$) de animais machos castrados ($n=4$) (Tabela 4).

Tabela 4– Comparação entre a concentração média \pm EPM (Mínimo-Máximo) de testosterona no sangue (ng/mL) e no pêlo (ng/g) de cães machos castrados e inteiros – São Paulo – 2008

Matriz	Sangue	Pêlo	P
castrados	$0,16 \pm 0,14$ (0,02-0,58)	$3,36 \pm 0,94$ (0,68-4,91)	0,0057
Inteiros	$1,34 \pm 0,30$ (0,16-4,49)	$7,26 \pm 1,71$ (1,50-29,40)	0,0001

Muitos trabalhos correlacionam positivamente concentrações de testosterona no sangue e no pêlo (YANG et al., 1998; KOREN; MOKADY; GEFFEN, 2006). Neste experimento não foi encontrada correlação significativa entre as duas matrizes nas seguintes variáveis: sangue vs pêlo de animais castrados ($r=0,46$; $p=0,5383$; $n=4$);

sangue vs pêlo de animais inteiros ($r=0,14$; $p=0,5352$; $n=21$) e sangue vs pêlo de todos os machos castrados e inteiros ($r=0,23$; $p=0,2771$; $n=25$)

Na figura 15 podemos visualizar através de um gráfico de linhas a concentração de testosterona no sangue (ng/mL) e no pêlo (ng/g) de cães machos (inteiros e castrados).

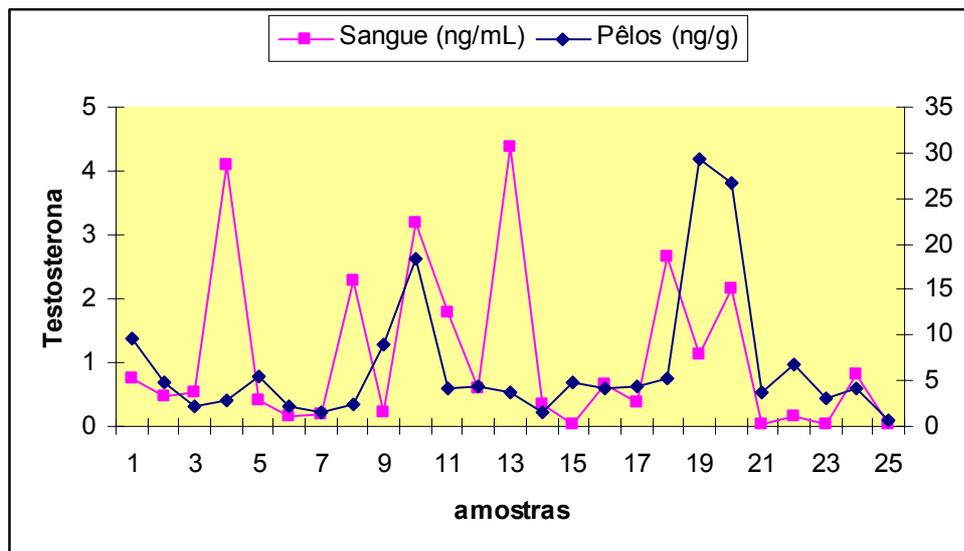


Figura 15 – Representação gráfica da comparação entre a concentração de testosterona no sangue (ng/mL) e no pêlo (ng/g) de cães machos – São Paulo - 2008

A falta de correlação entre as duas matrizes sangue e pêlo neste experimento pode ser explicada pelo fato do pêlo oferecer um perfil à longo prazo, não sendo capaz de detectar flutuações diárias como o sangue (BAUMGARTNER et al., 1979; KINTZ, et al., 1998; KOREN et al., 2002; ACCORSI et al., 2008). A utilização de cães da raça poodle se deve pelo fato desta raça apresentar a maioria dos pêlos em fase anágena, fase esta em que a papila folicular está em contato íntimo com vasos sangüíneos (POZEBON; DRESSLER; CURTIUS, 1999; DURANT et al., 2002; DAVENPORT et at., 2006) e a incorporação de substâncias ocorre por difusão

passiva como mencionado por Gleixner e Meyer (1997) e Thieme et al. (2003). Mesmo utilizando cães dessa raça não pode ser detectada uma correlação positiva entre as matrizes sangue e pêlo. Este aspecto pode ser muito interessante em estudos de estresse crônico no monitoramento dos efeitos de um enriquecimento ambiental, já que a amostra não sofre alteração das flutuações diárias de glicocorticóides e determina as concentrações médias ao longo de um período (ACCORSI et al., 2008).

Infelizmente devido ao número reduzido de animais castrados (n=4) em relação aos animais inteiros (n=21), não foi possível compará-los, como fizeram Gleixner e Meyer (1997). Porém as concentrações de testosterona no sangue são inferiores as encontradas no pêlo. Todos os animais já haviam sido castrados a no mínimo 1 ano e meio antes da colheita de pêlo.

5.5 Concentração de testosterona no pêlo de acordo com as regiões de colheita

Comparando as concentrações médias (\pm EPM) de testosterona no pêlo de acordo com a região de colheita (cabeça, corpo e membros) em animais inteiros (p=0,4290) (Figura 16) e animais castrados (p=0,7904) (Figura 17) não houve diferença significativa entre elas.(Tabela 5). A correlação entre as concentrações de testosterona encontradas entre regiões de colheita do pêlo de animais machos (cabeça, corpo e membros) foram significativas e positivas entre elas (p<0,0001), porém nos machos castrados analisados separadamente dos inteiros as regiões não apresentam correlação entre si.

Tabela 5 – Comparação entre a concentração média \pm EPM (Mínimo-Máximo) de testosterona no pêlo (ng/g) de cães machos castrados e inteiros de acordo com a região corpórea de colheita – São Paulo – 2008

Região	cabeça	Corpo	membros	<i>P</i>
Castrados	4,71 \pm 1,91 (0,26-7,96)	3,14 \pm 1,62 (0,26-7,54)	1,95 \pm 0,87 (0,26-4,39)	0,7904
Inteiros	6,84 \pm 2,16 (1,16-44,37)	6,69 \pm 1,84 (0,26-39,89)	6,25 \pm 1,77 (1,54-27,71)	

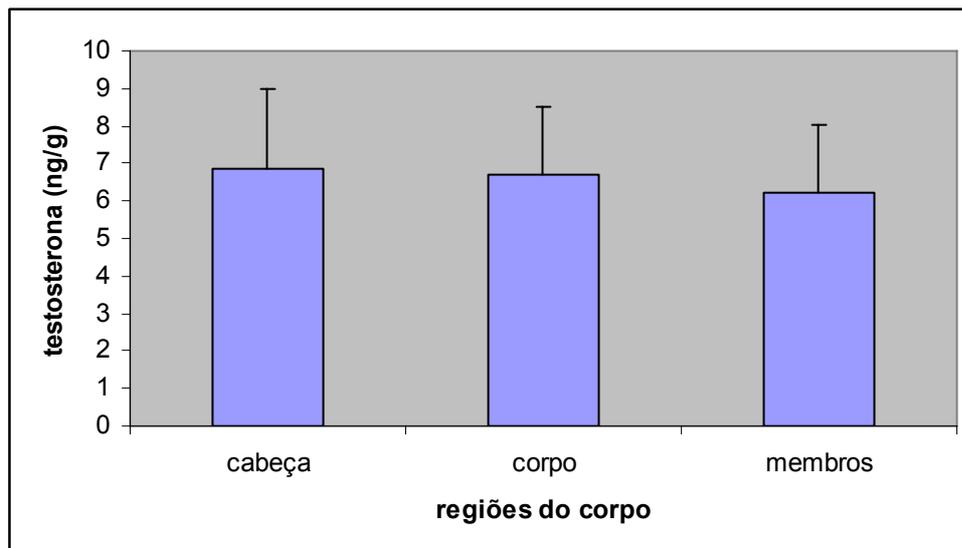


Figura 16 – Representação gráfica da comparação da concentração média (\pm EPM) de testosterona no pêlo de cães machos inteiros de acordo com a região de colheita – São Paulo -2008

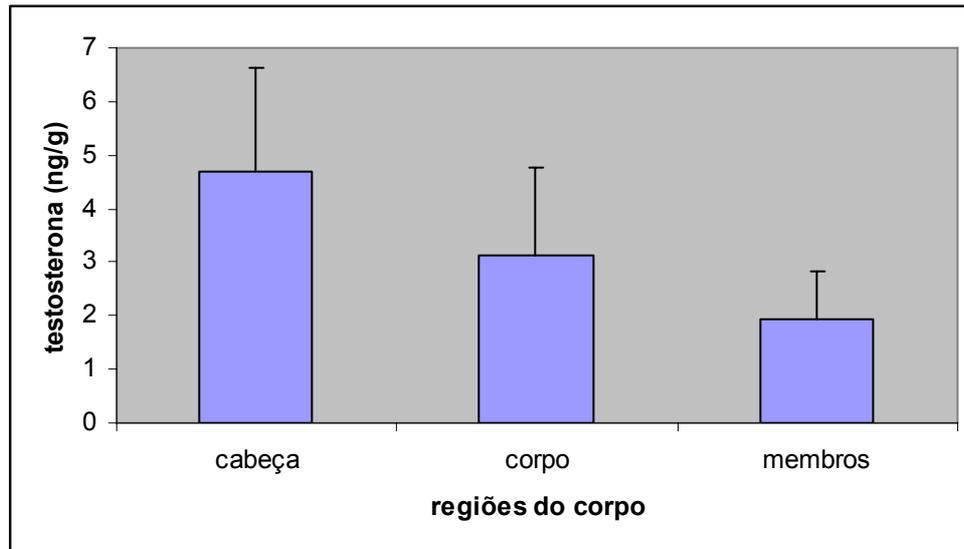


Figura 17 – Representação gráfica da comparação da concentração média (\pm EPM) de testosterona no pêlo de cães machos castrados de acordo com a região de colheita – São Paulo -2008

Sugere-se então, com estes resultados, que não há diferença colher pêlos da cabeça, ou do corpo ou dos membros dos animais. Isso corrobora com os resultados obtidos por Yang et al. (1998), Wheeler et al. (1998) e Davenport et al. (2006).

5.6 Concentração de testosterona no pêlo e sangue de acordo com a coloração da pelagem

Não foram observados neste estudo diferença significativa nas concentrações de testosterona no sangue ($p=0,8250$) e no pêlo ($p=0,5745$) de cães machos de acordo com a coloração de pelagem: branco, cinza, marrom e preto (Tabela 5 e Figura 17).

Tabela 5 – Concentração média (\pm EPM) de testosterona no pêlo (ng/g) de cães machos de acordo com a coloração da pelagem – São Paulo - 2008

cor	branca	Cinza	marrom	Preta	<i>P</i>
pêlo	8,06 \pm 2,54 (1,50-29,40)	3,23 \pm 1,09 (2,13-4,32)	6,67 \pm 2,55 (1,60-18,29)	3,57 \pm 0,99 (0,68-5,23)	0,5745

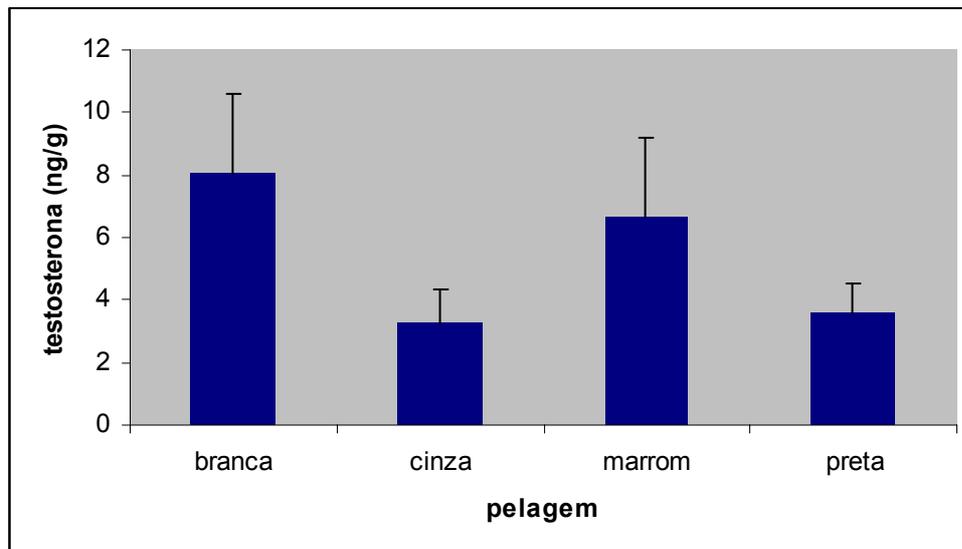


Figura 17 – Representação gráfica da comparação entre as concentrações médias (\pm EPM) de testosterona nos pêlos de cães machos de acordo com a cor da pelagem ($p=0,5745$) – São Paulo - 2008

A falta de diferença significativa entre as cores da pelagem neste experimento também foi determinado por outro estudo (DURANT et al., 2002). Dunnett e Lees (2003) sugerem que a pelagem de coloração preta, devido à impregnação de melanina auxilia incorporar substâncias no pêlo e possuem concentrações maiores de drogas do que o branco ou marrom. Já Gleixner e Meyer (1997) encontraram em bovinos concentração 4 vezes maiores de testosterona em animais de pêlos brancos do que os de pelagem preta.

5.7 Concentração de testosterona no pêlo e no sangue de machos e fêmeas

Através da comparação entre as matrizes sangue e pêlo, tentou-se evidenciar um método preditivo para identificar o sexo de animais livres na natureza. Para isso foram incluídas 6 fêmeas no experimento e quantificada a concentração de testosterona no sangue e no pêlo destes animais.

Comparando a matriz sangue entre machos e fêmeas obteve-se as seguintes concentrações média (\pm EPM) e respectivas diferenças significativas: fêmeas ($0,11\pm 0,01$ ng/mL, n=6) vs machos inteiros ($1,28\pm 0,29$ ng/mL, n=21, $p=0,0032$), fêmeas ($0,11\pm 0,01$ ng/mL, n=6) vs machos castrados ($0,02\pm 0,00$ ng/mL, n=4, $p<0,0001$). Na comparação entre todos os machos (inteiros e castrados) e fêmeas obteve-se os seguintes resultados: fêmeas ($0,11\pm 0,01$ ng/mL, n=6) vs todos os machos ($1,10\pm 0,26$ ng/mL, n=25, $p=0,0515$) não houve diferença estatística .

Já na matriz pêlo a comparação entre machos e fêmeas revelou os seguintes resultados: fêmeas ($2,20\pm 0,63$, n=6) vs machos inteiros ($7,26\pm 1,76$, n=21, $p=0,0074$) e fêmeas ($2,20\pm 0,63$, n=6) vs machos castrados e inteiros ($6,62\pm 1,47$, n=25, $p=0,0042$). Na comparação entre machos castrados e fêmeas não houve diferenças significativas entre eles ($p=0,3610$)(Tabelas 6, 7 e 8 e Figuras 18, 19 e 20).

Tabela 6 – Comparação entre a concentração média \pm EPM (Mínimo-Máximo) de testosterona no sangue (ng/mL) e pêlo (ng/g) de cães machos inteiros e fêmeas – São Paulo – 2008

Região	Machos inteiros	Fêmeas	<i>P</i>
Sangue	1,28 \pm 0,29 (0,02-4,39)	0,11 \pm 0,01 (0,10-0,18)	0,0032
Pêlo	7,26 \pm 1,76 (1,50-29,40)	2,20 \pm 0,63 (1,00-4,53)	0,0074

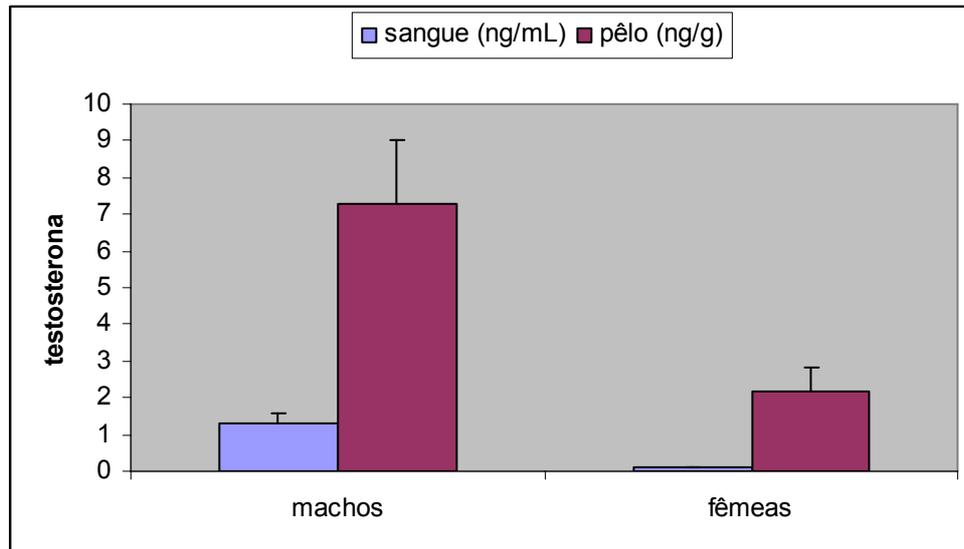


Figura 18 – Representação gráfica da comparação entre as concentrações médias (\pm EPM) de testosterona no sangue (ng/mL) ($p=0,0032$) e no pêlo (ng/g) ($p=0,0074$) cães machos inteiros e fêmeas – São Paulo - 2008

Tabela 7 – Comparação entre a concentração média \pm EPM (Mínimo-Máximo) de testosterona no sangue (ng/mL) e pêlo (ng/g) de cães machos castrados e fêmeas – São Paulo – 2008

Região	Machos castrados	Fêmeas	<i>P</i>
Sangue	0,02 \pm 0,00 (0,02-0,03)	0,11 \pm 0,01 (0,10-0,18)	<0,0001
Pêlo	3,26 \pm 0,94 (0,68-4,91)	2,20 \pm 0,63 (1,00-4,53)	0,3610

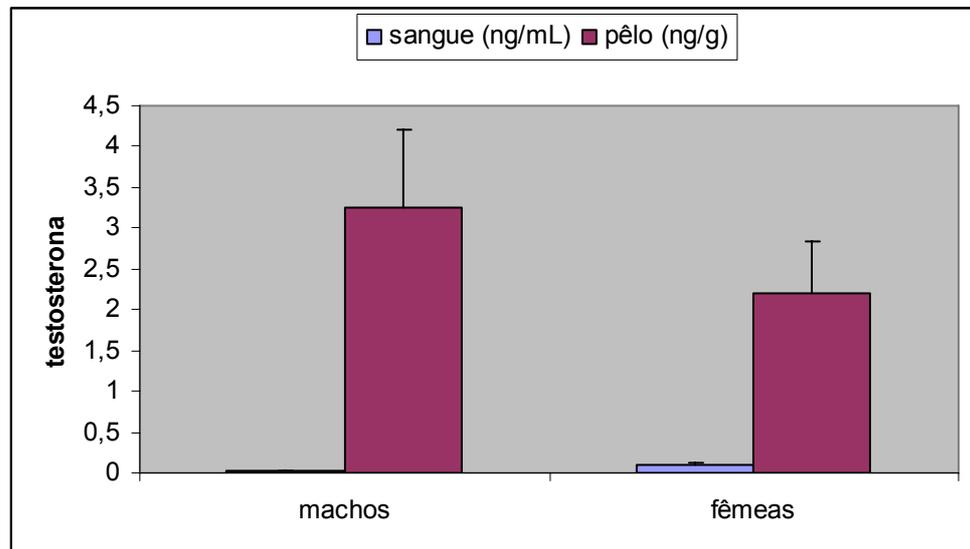


Figura 19 – Representação gráfica da comparação entre as concentrações médias (\pm EPM) de testosterona no sangue (ng/mL) ($p < 0,0001$) e no pêlo (ng/g) ($p = 0,3610$) cães machos castrados e fêmeas – São Paulo - 2008

Tabela 8 – Comparação entre a concentração média \pm EPM (Mínimo-Máximo) de testosterona no sangue (ng/mL) e pêlo (ng/g) de todos os machos e fêmeas – São Paulo – 2008

Região	Todos os Machos	Fêmeas	<i>P</i>
Sangue	1,10 \pm 0,26 (0,02-4,39)	0,11 \pm 0,01 (0,10-0,18)	0,0515
Pêlo	6,62 \pm 1,47 (0,68-29,40)	2,20 \pm 0,63 (1,00-4,53)	0,0442

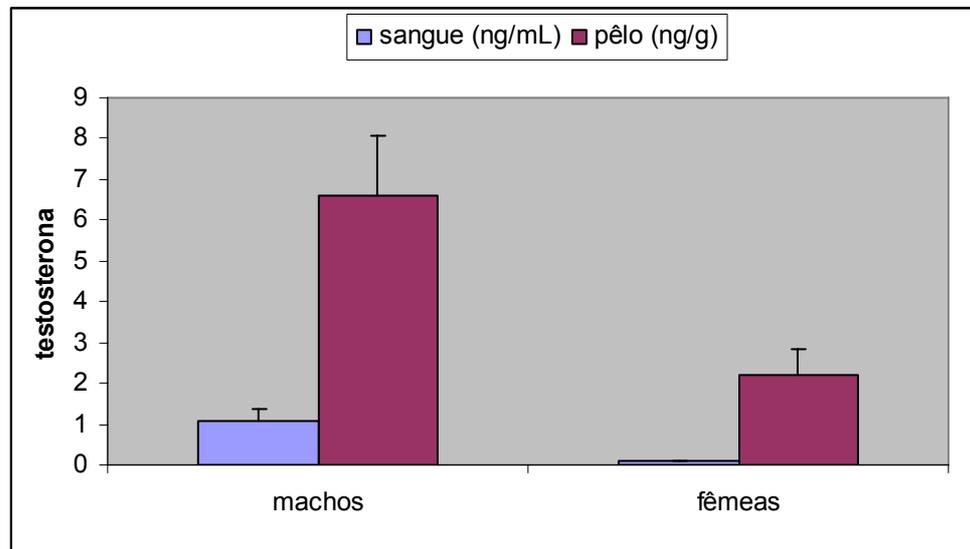


Figura 20 – Representação gráfica da comparação entre as concentrações médias (\pm EPM) de testosterona no sangue (ng/mL) ($p < 0,0515$) e no pêlo (ng/g) ($p = 0,0442$) todos os machos e fêmeas – São Paulo - 2008

Nas fêmeas não houve correlação entre as matrizes sangue e pêlo ($r = 0,23$; $p = 0,6537$), ou seja a concentração de testosterona encontrada no pêlo não reflete a concentração encontrada no sangue.

Os machos apresentam uma concentração de testosterona maior do que fêmeas, tanto no sangue quanto nos pêlos, porém, a proporção da concentração no

sangue é menor do que nos pêlos. Estas afirmações corroboram com as encontradas por outros autores (WHEELER et al., 1998). Portanto, através do pêlo como matriz biológica pode-se determinar que cães machos apresentam concentrações maiores de testosterona do que fêmeas ($p=0,0442$).

Castilhos (2006) afirmou que as concentrações séricas de testosterona nos machos são significativamente maiores do que a de fêmeas, apresentando níveis mínimos detectáveis pelo ensaio, o que corrobora com os resultados obtidos neste experimento. A utilização do pêlo para determinação do hormônio testosterona em fêmeas pode ser caracterizada como outra via de acesso para obtenção deste resultado, no entanto, estudos mais detalhados seriam necessários para a confirmação desta hipótese.

Entre as 6 fêmeas do experimento, uma, apresentou altas concentrações de testosterona no pêlo em relação às outras (Figura 21).

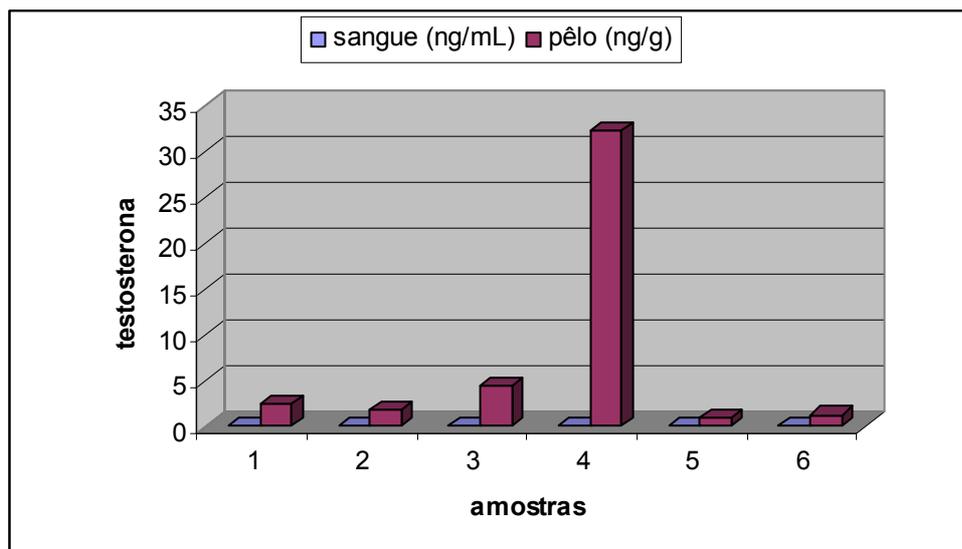


Figura 21 – Representação gráfica da concentração média de testosterona em cães fêmeas no sangue (ng/mL) e no pêlo (ng/g) de acordo com a região de colheita do pêlo – São Paulo - 2008

Os altos valores de testosterona encontrados no pêlo deste animal, não refletem o mesmo na matriz sangüínea. Isso poderia ser explicado pelo fato desta fêmea estar no 14º. dia do ciclo estral, período em que altas concentrações dos compostos estrogênicos estão circulantes. Na cadeia de biotransformação dos hormônios esteróides sexuais, o precursor do 17- β -estradiol é a testosterona (PFAFF; PHILLIPS; RUBIN, 2004). Como o pêlo reflete as alterações passadas e estas permanecem armazenadas por mais de semanas (BAUMGARTNER et al., 1979; KINTZ et al., 1998; KOREN et al., 2002), e através desta matriz pode-se detectar uma substância xenobiótica (17 α -etinilestradiol) de 7 a 14 dias após sua aplicação (DURANT et al., 2002) talvez pudéssemos utilizar o pêlo para prever o início de um novo ciclo estral nas fêmeas. Para confirmação desta hipótese, novos ensaios são necessários para se determinar o início da deposição da testosterona e do estradiol no pêlo de fêmeas.

5.8 Considerações finais

Através do pêlo outros hormônios poderiam ser quantificados como o estrógeno e o cortisol. Vale a pena ressaltar a aplicabilidade desta metodologia não-invasiva para monitoramento de estresse crônico em animais cativos submetidos a enriquecimento ambiental, já que o pêlo oferece um perfil à longo prazo (semanas e meses), não sendo capaz de monitorar flutuações hormonais diárias (KOREN et al., 2002; ACCORSI et al., 2008).

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- É possível determinar as concentrações do hormônio testosterona no pêlo de cães.
- Os dois protocolos de extração de testosterona no pêlo demonstraram-se eficientes, porém o segundo apresenta maior recuperação hormonal do que o primeiro.
- Não há correlação positiva entre os níveis hormonais de testosterona encontrados no sangue e no pêlo.
- Há diferença estatística significativa entre as concentrações de testosterona no pêlo de acordo com o sexo: entre fêmeas e machos inteiros ($p=0,0074$) e entre fêmeas e machos (castrados e inteiros) ($p=0,0042$). Não há diferença entre fêmeas e machos castrados ($p=0,3610$).
- Não há diferença significativa das concentrações de testosterona no pêlo entre animais machos inteiros ou castrados.
- Não há diferença estatística significativa das concentrações de testosterona no pêlo entre as regiões de colheita da amostra (cabeça, corpo ou membros), pois em todos os animais há correlação positiva entre essas áreas.
- Não há diferença significativa das concentrações de testosterona no pêlo de acordo com a coloração da pelagem (branca, cinza, marrom e preta).

- Não há diferença estatística significativa das concentrações de testosterona no armazenamento do extrato do pêlo ressuspendido por até 30 dias na geladeira ou freezer.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ACCORSI, P. A.; CARLONI, E.; VALSECHI, P.; VIGGIANI, R.; GAMBERONE, M.; TAMINI, C.; SEREN, E. Cortisol determination in hair and faeces from domestic cats and dogs. **General and Comparative endocrinology**, v.155, n. 2, p. 398-402, 2008.
- AMARAL, R. S. **Uso de diferentes matrizes biológicas na dosagem de andrógenos em peixes-bois da Amazônia machos (*Trichechus inunguis*) mantidos em cativeiro**. 2008. 85 f. Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008
- BARRETT, G. M.; SHIMIZU, K.; BARDI, M.; SHINSUKE, A.; MORI, A. Endocrine correlates of rank, reproduction and female-directed aggression in male Japanese macaques (*Macaca fuscata*). **Hormones and behavior**, v. 42, p. 85-96, 2002.
- BAUMGARTNER, A. M.; JONES, P. F.; BAUMGARTNER, W. A.; BLACK, C. T. Radioimmunoassay of hair for determining opiate-abuse histories. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 20, p. 748-752, 1979.
- BROWN, J. L.; GRAHAM, L. H.; WIELEBNOWSKI, N.; SWANSON, W. F.; WILDT, D. E.; HOWARD, J. G. Understanding the basic reproductive biology of wild felids by monitoring of faecal steroids. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 57, p. 71-82, 2001.
- CAPEZZUTO, A. **Excreção fecal de progesterona e 17 β -estradiol: estudo endocrinológico longitudinal durante a gestação em cabras (*Capra hircus*, Linnaeus, 1758)**. 2005. 116 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- CASTILHOS, L. R. **Concentrações séricas de testosterona e agressividade em cães**. 2006. 113f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- CERLING, T. E.; PASSEY, B. H.; AYLIFFE, L. K.; COOK, C. S.; EHLERINGER, J. R.; HARRIS, J. M.; DHINDHA, M. B.; KASIKI, S. M. Orphans' tales: seasonal dietary changes in elephants from Tsavo National Park, Kenya. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 206, p. 367-376, 2004.
- CERLING, T. E.; WIETTEMAYER, G.; RASMUSSEN, H. B.; VOLLRATH, F.; CERLING, C. E.; ROBINSON, T. J.; DOUGLAS-HAMILTON, I. Stable isotopes in elephant hair document migration patterns and diet change. **PNAS**, v. 103, p. 371-373, 2006.
- COOK, C. J.; HARRIS, M. D.; INGRAM, J. Hands-on e and hands-off measurement of stress In: MOBERG, G. P., MENCH, J. A. **The biology of animal stress: basic principles and implications for welfare**. Oxon, UK: CAB International Wallingford, 2000. Cap. 6. p.123-146.

DAVENPORT, M.; TIEFENBACHER, S.; LUTZ, C. K.; NOVAK, M. A.; MEYER, J. S. Analysis of endogenous cortisol concentrations in the hair of rhesus macaques. **General and Comparative Endocrinology**, v. 147, p. 255-261, 2006.

DELVILLE, Y.; MANSOUR, K. M.; FERRIS, C. F. Testosterone facilitates aggression by modulating vasopressin receptors in the hypothalamus. **Physiology & Behavior**, v. 60, n. 1, p. 25-29, 1996.

DIAZ, S. F.; TORRES, S. M. F.; DUNSTAN, R. W.; LEKCHAROENSUK, C. An analysis of canine hair re-growth after clipping for a surgical procedure. **Veterinary Dermatology**, v.15, p. 25-30, 2004.

DLONIAK, S. M.; FRENCH, J. A.; PLACE, N. J.; WELDELE, M. L.; GLICKMAN, S. E.; HOLEKAMP, K. E. Non-invasive monitoring of fecal androgens in spotted hyenas (*Crocuta crocuta*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 135, p. 51-61, 2004.

DUNNETY, M.; LEES, P. Trace element, toxin and drug elimination in hair with particular reference to the horse. **Research in Veterinary Science**, n. 75, p. 89-1001, 2003.

DURANT, A. A.; FENTE, C. A.; FRANCO, C. M.; VÁZQUEZ, B. I.; CEPEDA, H. Gás chromatography- tandem mass spectrometry determination of 17 β -ethilnyslestradiol residue in the hair of cathe. Application to the treated animals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p.436-440, 2002.

GIAMMANCO, M.; GARDEN, T.; GIAMMANCO, S.; DI MAJO, D.; LA GUARDIA, M. Testosterone and aggressiveness. **Medicine Science Monitorement**, v. 11, n. 4, p. 136-145, 2005.

GLEIXNER, A.; MEYER, H. H. D. Detection of estradiol and testosterone in hair of cattle by HPLC/EIA. **Fresenius Journal Analytical Chemistry**, n. 357; p. 1198-1201, 1997.

GOODROWE, K. L.; CHAKRABORTY, P. K.; WILDT, D. E. Pituitary and gonadal response to exogenous LH-releasing hormone in the male domestic cat. **Journal of Endocrinology**, v. 105, p. 175-181, 1985.

GOULD, L.; ZIEGLER, T. E. Variation in fecal testosterone levels, inter-male aggression, dominance rank and age during mating and post-mating periods in wild adult male ring-tailed lemurs (*Lemur catta*). **American Journal of primatology**, v. 69, p. 1325-1339, 2007.

GUNARATNAM, P.; WILKINSON, G. T. A study of normal hair growth in the dog. **Journal Small Animal Practice**, v. 24, p. 445-453, 1983.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. Hormônios fatores de crescimento e reprodução. In: _____ **Reprodução Animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004, p. 42.

HÖLD, K. M.; HUBBARD, D. L.; WILKINS, D.; ROLLINS, D. E. Quantification of cocaine into human hair: the effect of centrifugation of hair digest. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 22, n.6, p. 430-434, 1998.

IUCN 2006. **2006 IUCN Red List of Threatened Species**. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 12.fev. 2007.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M. **Principles of neural science**. 4.ed. New York: McGraw-Hill. 2000. 1414 p.

KINTZ, P. Hair testing and doping control in sport. **Toxicology Letters**, v. 102-103, p. 109-113, 1998.

KINTZ, P.; CIRIMELE, V.; SACHS, H.; LUDS, B. Testing for anabolic in hair from two bodybuilders. **Forensic Science International**, v. 101, p. 209-216, 1999.

KOREN, L.; MOKADY, O.; GEFFEN, E. Elevated testosterone levels and social ranks in female rock hyrax. **Hormones and behavior**, n. 49, p. 470-477, 2006.

KOREN, L.; MOKADY, O.; KARASKOU, T.; KLEIN, J.; KOREN, G.; GEFFEN, E. A novel method using hair for determining hormonal levels in wildlife. **Animal behaviour**, n. 63, p. 403-406, 2002.

KUGELMEIER, T. **Avaliação endocrinológica do ciclo ovariano de macaco bugio (Alouata caraya - HUMBOLDT, 1812) por meio de extração e dosagem de metabólitos de esteróides fecais**. 2005. 120f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

LEMLE, M. **Estudo com sêmen de cão pode ajudar a salvar lobo guará**. Disponível em: <http://www.faperj.br/versao-impressao.phtml?obj_id=2372> Acesso em: 27.jan.2006.

LI, X.; ZHOU, X., LI, J.; GUO, Q. L.; ZHENG, F.; LU, M. X.; SEGBO, J.; PENG, J. H.; YAN, S. K. The clinical evaluation for the mitochondrial DNA detected from hair follicles. **Clinica Chimica Acta**, n. 361, p. 214-216, 2005.

LITWACK, G.; SCHMIDT, T. J. Bioquímica de hormônios II: hormônios esteróides. In: _____. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. São Paulo: Edgard Blücher, 1998. p. 747-767.

MARCOS, V.; PEROGORDO, E.; ESPINOSA, P.; MARTÍN de POZUELO, M.; HOOGHUIS, H. Multiresidue analysis of anabolic compounds in bovine hair by gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 507, p. 219-227, 2004.

MEHTA, P.; JOSEPHS, R. A. Testosterone change after losing predicts the decision to compete again. **Hormones and Behavior**, v. 50, p. 684-692, 2006.

NESBITT, G. H.; ACKERMAN, L. J. Structure and function of skin. In: _____. **Canine & feline dermatology – Diagnosis and Treatment**. USA: Published Veterinary Learning Systems, 1998. p. 6-24.

NORMAN, A. W.; LITWACK, G. Steroids hormones: chemistry, biosynthesis and metabolism. In: _____. **Hormones**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1997. p. 49-85.

NOVAIS, A.A. **Prevalência dos antígenos eritrocitários caninos em cães domésticos (*Canis familiaris*) e investigação dos parâmetros hematológicos e da ocorrência de antígenos eritrocitários em lobos guará (*Chrysocyon brachyurus*) e cachorros do mato (*Cerdocyon thous*) criados no Brasil**. 2003. 63 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

PAZ, R. C. R.; OLIVEIRA, C. A.; NICHI, M.; ADANIA, C. H.; DIAS, E. A.; BARNABE, V. H. ; BARNABE, R. C. Comparação de métodos para análise de metabólitos fecais de glicocorticóides em jaguatirica (*Leopardus pardalis*) submetidas a tratamento hormonal e vídeo-laparoscopia. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, n. 6, p. 444-453, 2007.

PEREIRA, M. S.; FURTADO, P. V.; CALAMARI, C. V.; OLIVEIRA, C. A. A utilização do pêlo como matriz biológica de monitoramento reprodutivo não invasivo em gato doméstico (*Felis catus*) como modelo experimental. In: CONGRESSO E ENCONTRO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS DE ANIMAIS SELVAGENS, 10., 2006, São Pedro. **Anais...**São Pedro: ABRAVAS, 2006. p. 102.

PFUFF, D. W.; PHILLIPS, M. I.; RUBIN, R. T. Hormone metabolites can be the behaviorally active compounds In: _____. **Principles of hormonal behavior relations**. Califórnia: Elsevier Academic Press, 2004. p. 61-65.

PIZZUTTO, C. S. **Estudo sobre a influência de técnicas de enriquecimento ambiental nos parâmetros endócrino-comportamentais de antropóides não-humanos mantidos em cativeiro**. 2006. 172 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

POZEBON, D.; DRESSLER, V. L.; CURTIUS, A. Análise do cabelo: uma revisão dos procedimentos para a determinação dos elementos traço e aplicações. **Química Nova**, n. 22, v. 6, p. 838-846, 1999.

SACHS, H. History of hair analysis. **Forensic Science International**, v. 84, p. 7-16, 1997.

SAS. Statistical analysis system. SAS user's guide: statistics. Cary: SAS, 2000.

SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, G. E. Structure and function of skin. In _____. **Small animal dermatology**. 6. ed. Philadelphia: Saunders, 2001. p. 108-112.

SELAVKA, C. M.; RIEDERS, F. The determination of cocaine in hair: a review. **Forensic Science International**, v. 70, p. 155-164, 1995.

SGAI, M. G. F. G. **Avaliação da influência das técnicas de enriquecimento ambiental nos parâmetros endócrinos e comportamentais de *Callithrix penicillata* (sagüi-de-tufos-pretos) mantidos em estabilidade social e isolados**. 2007. 109 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

SHARGAL, D.; SHORE, L.; ROTERI, N.; TERKEL, A.; ZOROVSKY, Y.; SHEMESH, M.; STEINBERGER, Y. Fecal testosterone is elevated in high ranking female ibexes (*Capra nubiana*) and associated with increased aggression and a preponderance of male offspring. **Theriogenology**, v. 69, p. 673-680, 2008.

SILVA, M. R. C. **Comparação das concentrações de progesterona sérica e progestinas fecais em cadelas**. 2005. 90 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

SIMPSON, K. The role of testosterone in aggression. **McGill Journal of Medicine**, v. 6, p. 32-40, 2001.

SOCIETY OF HAIR TESTING. Recommendations for hair testing in forensic cases. **Forensic Science International**, v. 145, p. 83-84, 2004.

SROGI, K. Testing for drugs in hair – a review of chromatographic procedures. **Microchimica Acta**, v. 154, p. 191-212, 2006.

THIEME, D.; ANIELSKI, P.; GROSSE, J.; SACHS, H.; MULLER, R. K. Identification of anabolic steroids in serum, urine, sweat and hair comparison of metabolic pattern. **Analytica Chimica Acta**, n. 483, p. 299-306, 2003.

VAN DE HAUWE, D.; DUMOULIN, F.; ELLIOTT, C.; VAN PETEGHEM, C. Detection of synthetic glucocorticoid residues in cathe tissue and hair samples after a single dose administration using LC-MS/MS. **Journal of Chromatography B**, n. 817, p. 215-223, 2005.

VIAU, P. **Estudo da função ovariana em fêmeas de onça pintada (*Panthera onca*, Linnaeus, 1758) mantidas em cativeiro, por meio da extração e quantificação de esteróides fecais**. 2003. 83 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

WHEELER, M. J.; ZHONG, Y. B.; KICMAN, A.T.; COUTTS, S. B. The measurement of testosterone in hair. **Journal of Endocrinology**, n. 159, p.R5-R8, 1998.

WILDT, D.; PUKAZHENTHI, B.; BROWN, J.; MONFORT, S.; HOWARD, J. G.; ROTH, T. Spermatology for understanding, managing and conserving rare species. **Reproduction Fertility and Development**, v. 7, n. 4, p. 811-824, 1995.

WINGFIELD, J. C.; HEGNER, R. E.; DUFTY JR, A. M.; BALL, G. F. The Challenge Hypothesis: theoretical implications for patterns of testosterone secretion, mating systems and breeding strategies. **The American Naturalist**, v. 136, n. 6, p. 829-846, 1990.

YANG, H. Z.; LAN, J.; MENG, Y. L.; WAN, X. J.; HAN, D. W. A preliminary study of steroid reproductive hormones in human hair. **Journal Steroid Biochemistry Molecular Biology**, v. 67, n. 5-6, p. 447-450, 1998.

ANEXOS

Anexo A

Resultados dos Ensaio

Ensaio 1 – Protocolo 2

Tabela de identificação dos animais e amostras

(Continua)

No..	Nome	Sangue T ng/mL	Região	Pêlo T ng/g	Data da colheita	Castração	COR	Peso	idade
1	Paco	0,75	CAB	5,04	25/06/07		BCO	3	2000
2			COR	8,27					
3			MEM	15,43					
4	Picachu	0,46	CAB	3,84	25/06/07		BCO	2	2004
5			COR	4,36					
6			MEM	6,46					
7	Picasso	0,52	CAB	2,50	25/06/07		BCO	2	2004
8			COR	1,98					
9			MEM	2,02					
10	Pepe	4,10	CAB	1,16	25/06/07		BCO	5	2001
11			COR	2,22					
12			MEM	4,92					
13	Caster	0,41	CAB	4,81	25/06/07		BCO	3	1994
14			COR	5,31					
15			MEM	6,59					
16	Trapito	0,17	CAB	2,30	25/06/07		CIN	4	2000
17			COR	0,79					
18			MEM	3,30					
19	Coffee	0,20	CAB	1,81	25/06/07		MAR	3	1999
20			COR	0,26					
21			MEM	2,74					
22	Bambino	2,27	CAB	2,34	25/06/07		MAR	2	2004
23			COR	2,16					
24			MEM	2,99					
25	Cigano	0,23	CAB	4,11	25/06/07		MAR	3	2002
26			COR	9,29					
27			MEM	13,79					
28	Ruanilho	3,20	CAB	12,14	25/06/07		VER	4	2002
29			COR	15,03					
30			MEM	27,71					
31	Conan	1,79	CAB	2,54	25/06/07		VER	3	2001
32			COR	3,59					
33			MEM	6,61					
34	Bingo	0,58	CAB	7,81	20/07/07	18/08/05	CINZ	10	1994
35			COR	3,51					

(Continuação)

No..	Nome	Sangue T ng/mL	Região	Pêlo T ng/g	Data da colheita	Castração	COR	Peso	idade
36			MEM	1,63					
37	Nick	4,39	CAB	2,20	12/07/07		BCO	10	2004
38			COR	3,50					
39			MEM	5,24					
40	Johnny	0,35	CAB	1,47	02/08/07		BCO	4	2000
41			COR	1,50					
42			MEM	1,54					
43	Ice	0,03	CAB	2,81	10/09/07	31/08/05	BCO	24	2000
44			COR	7,54					
45			MEM	4,39					
46	Rower	0,66	CAB	3,95	10/09/07		PRE	5	2001
47			COR	4,31					
48			MEM	4,40					
49	Speed	0,39	CAB	4,91	10/09/07		MAR	23	2001
50			COR	3,30					
51			MEM	4,79					
52	Theodore	2,65	CAB	6,73	10/09/07		PRE	25	2005
53			COR	4,45					
54			MEM	4,51					
55	Dodô	1,12	CAB	23,55	11/09/07		BCO	5	1999
56			COR	39,89					
57			MEM	24,77					
58	Lupi	2,17	CAB	44,37	13/09/07		BCO	8	2005
59			COR	11,09					
60			MEM	24,82					
61	Coty	0,02	CAB	2,18	15/09/07		BCO	8	2005
62			COR	6,52					
63			MEM	2,24					
64	Stephano	0,16	CAB	7,58	07/10/07		BCO	20	2000
65			COR	7,60					
66			MEM	5,16					
67	Snow	0,02	CAB	7,96	07/10/07	01/09/03	BCO	20	2000
68			COR	1,24					
69			MEM	0,26					
70	Snoopy	0,81	CAB	4,17	07/10/07		PRE	20	2002
71			COR	5,00					
72			MEM	3,27					
73	Mike	0,02	CAB	0,26	07/10/07	01/02/06	PRE	21	1995
74			COR	0,26					
75			MEM	1,51					
76	Bisteca	0,10	CAB	2,78	08/12/07		BCA	13	1998
77			COR	1,00					
78			MEM	3,40					
79	Pitu	0,10	CAB	3,40	08/12/07	22/08/01	MAR	15	1994
80			COR	1,00					

(Conclusão)

No..	Nome	Sangue T ng/mL	Região	Pêlo T ng/g	Data da colheita	Castração	COR	Peso	idade
81			MEM	1,00					
82	Babi	0,10	CAB	1,00	08/12/07	06/11/04	PRE	10	1994
83			COR	11,60					
84			MEM	1,00					
85	Yumi	0,10	CAB	36,69	07/12/07		PRE	6	2005
86			COR	25,41					
86			MEM	34,58					
87	Pretinha	0,10	CAB	1,00	08/12/07		CIN	10	2001
88			COR	1,00					
89			MEM	1,00					
90	Meg	0,18	CAB	1,00	08/12/07		CIN	10	2005
91			COR	1,86					
92			MEM	1,00					

Ensaio 2 – Protocolo 1

Animal	Cor	T (ng/mL) soro	Região Corpórea	T (ng/g) pêlo Protocolo 1
Bambino	Marrom	2,27	Cabeça	0,10
			Corpo	0,68
			Membros	0,10
Ruanilho	Marrom	3,20	Cabeça	3,08
			Corpo	3,53
			Membros	3,15
Lupi	Branco	2,17	Cabeça	3,37
			Corpo	1,47
			Membros	0,98
Snoopy	Preto	0,81	Cabeça	0,10
			Corpo	0,10
			Membros	0,73
Mike	Preto	0,02	Cabeça	0,10
			Corpo	0,10
			Membros	0,10

0,10 é o menor valor detectado no ensaio

Anexo B

Projeto Piloto

Para a execução da 1ª. fase do projeto piloto foram utilizados 8 cães:

- Babi, fêmea, cinza, raça poodle, 6 anos
- Ianca, fêmea, dourada, raça cocker, 3 anos
- Bonga, fêmea, cinza, raça poodle, 6 anos
- Nevinha, fêmea, branca, raça poodle, 4 anos
- Sheik, macho, branco, raça poodle, 3 anos
- Beethoven, macho, tricolor, raça São Bernardo, 4 anos
- Mel, macho, branco, raça poodle, 3 anos
- Ebany, fêmea, cinza, raça poodle, 7 anos.

Os pêlos foram colhidos dos animais com auxílio de máquina de tosa ou tesoura, acondicionados em sacos de papel devidamente identificados e armazenados em temperatura ambiente até o momento da extração.

1º. Experimento:

Objetivo: utilizar a técnica descrita por Yang et al. (1998) para extração e quantificação hormonal de progesterona de pêlos de 3 animais de 3 diferentes regiões do corpo: cabeça, corpo e membros.

Metodologia: 50mg de pêlos cortados com o auxílio de uma tesoura em pequenos pedaços foram colocados em um tubo de ensaio e adicionados 2mL de solvente e agitado no vortex por 1 minuto. Esta solução A ficou em descanso por 1 hora até que o líquido fosse extraído e transferido para outro tubo de ensaio. Foi adicionado novamente 1mL de solvente ao tubo de ensaio original que continha os pêlos e repetido o processo até que esta solução B fosse então extraída e acrescentada à solução A. As duas soluções foram homogeneizadas e secas em banho maria a 40°C. Os tubos secos foram ressuspensos com 0,2mL solução tampão (PBS pH 7,0).

Observação: neste experimento foi utilizado o hormônio progesterona para testes iniciais, pois não havia kits de testosterona disponíveis.

Resultados:

Animal	Colheita	Ens	Extração	Dosagem	P4 ng/mL		
					cabeça	corpo	membros
Babi	02/02/06	1	06/02/06	07/02/06	5,94	2,82	0,83
		2	14/02/06	21/02/06	5,33	0,94	3,09
		3	20/02/06	21/02/06	21,85	0,41	1,19
lanca	28/01/06	1	30/01/06	07/02/06	5,07	2,22	2,86
		2	14/02/06	21/02/06	0,98	1,07	0,87
		3	20/02/06	21/02/06	2,86	0,47	0,98
Babi	02/02/06	1	14/02/06	21/02/06	1,91	1,36	5,43
		2	20/02/06	21/02/06	1,13	1,43	5,26

2º. Experimento:

Objetivo: verificar se no tubo que contém os pêlos e adiciona-se o solvente éter para a extração hormonal, permanece hormônio (no caso metabólitos de progesterona) aderido em sua parede.

Metodologia: utilizou-se a técnica descrita por Yang et al. (1998), porém após a extração do solvente éter, os pêlos deste tubo foram removidos com pinça, secos em banho maria, ressuspensos com PBS e quantificados através de radioimunoensaio.

Resultados:

Nevinha	Tubo A	Tubo B
	P4 ng/mL	P4 ng/mL
Cabeça	0,23813	1,3585
Corpo	0,08737	1,1934
Membros	0,10876	1,3940

Tubo A: tubo que contém os pêlos

Tubo B: tubo que recebeu a solução com éter e foi seco em banho maria

3º. Experimento:

Objetivo: quantificar o hormônio testosterona de 2 cães machos por meio da técnica descrita por Yang et al. (1998) e compará-los com os níveis sanguíneos.

Metodologia: Cerca 5 mL de sangue foi colhido por punção de veia radial, no mesmo dia da colheita do pêlo. A amostra foi centrifugada a 1.500g durante 10 minutos e o soro obtido armazenado a -20°C até a dosagem hormonal por radioimunoensaio.

Resultados:

Animal	Colheita	Ens	Extração	Dosagem	T sg ng/mL	T ng/g cabeça	T ng/g corpo	T ng/g membros
Beethoven	28/01/06	1	20/02/06	21/02/06	0,96	0,79	-	0,40
		2	20/02/06	14/03/06		0,34	-	0,67
Sheik	02/02/06	1	20/02/06	21/02/06	3,14	2,67	2,12	-
		2	20/02/06	14/03/06		1,82	2,10	3,70

4º. Experimento:

Objetivo: utilizar um mix de pêlos das 3 diferentes regiões do corpo de 4 animais e verificar se existe diferença entre o tempo de extração, armazenagem na geladeira e dosagem hormonal de testosterona.

Metodologia: utilizar o protocolo descrito por Yang et al. (1998) e quantificado os metabólitos de testosterona.

Resultados:

Animal	T ng/g a*	T ng/g b*
Mel	1,900	1,600
Ebany	0,006	0,300
Babi	0,004	0,070
Bonga	-	0,640

*a colheita: 21/09/05, extração: 14/02/06, dosagem: 21/02/06

* b colheita: 21/09/05, extração: 20/02/06, dosagem: 21/02/06

5º. Experimento:

Objetivo: avaliar 3 diferentes solventes éter, etanol e metanol para a dosagem hormonal com progesterona do animal Bonga.

Metodologia: utilizando o protocolo de Yang et al. (1998) o tubo com solvente éter foi seco em banho-maria e os tubos com etanol e metanol secos em ar comprimido.

Resultados:

Solvente	P4 ng/mL
Éter	< 0,0290
Ethanol	1,8324
Metanol	2,0161

Com base nos resultados insatisfatórios obtidos através do éter no 5º. experimento e pela revisão de literatura que indicava o metanol utilizado pela maioria dos autores, optou-se pela utilização do solvente metanol.

2ª. Fase do Projeto Piloto

Para a execução da 2ª. fase do projeto piloto foram utilizados 2 cães:

- Beethoven, macho, raça São Bernardo, 4 anos.
- Sheik, macho, raça poodle, 3 anos.

6º. Experimento:

Objetivo: quantificar o hormônio testosterona de 2 machos de acordo com a região da colheita dos pêlos e comparar com os níveis encontrados no sangue.

Metodologia: utilizar o protocolo descrito por Yang et al. (1998) mas utilizar o metanol ao invés do éter como solvente.

Resultados:

Animal	Colheita	Extração	T sg ng/mL	T ng/g cabeça	T ng/g corpo	T ng/g membros
Beethoven	28/01/06	17/05/06	0,96	1,67	1,93	1,46
Sheik	02/02/06	17/05/06	3,14	6,21	10,57	12,08

A partir destes resultados optou-se em trabalhar apenas com os pêlos da região do corpo destes animais e fazer sucessivos testes com os mesmos, já que os resultados encontrados no 6º. experimento foram satisfatórios e havia uma quantidade maior da amostra desta região.

7º. Experimento:

Objetivo: testar modificações nos protocolos utilizando pêlos de machos para extração dos metabólitos de testosterona.

Metodologia: através de algumas modificações nos protocolos descritos por Yang et al. (1998) e Baumgartner et al. (1979), foram aplicadas diferentes quantidades de solvente metanol e diferentes períodos de incubação. Todos os tubos foram secos em ar comprimido e ressuspendidos com PBS.

Resultados:

Beethoven

	T ng/g	T ng/g		
Δt	2mL	3mL	Dosagem	Steps
Incubação/solvente				
2 horas		2,34	48 h	2
		1,93	48 h	2
		1,33	48 h	2
		1,16	72 h	2
		1,43	24 h	2
		1,60	48 h	1
		1,63	24 h	2
24 horas	1,64		48 h	1
	2,35		48 h	1
48 horas	2,57	2,91	Mesmo dia	1
	3,99	4,68	Mesmo dia	1
	2,66	2,19	Mesmo dia	1
	2,81		Mesmo dia	1

Sheik

	T ng/g	T ng/g		
Δt	2mL	3mL	Dosagem	Steps
Incubação/solvente				
2 horas		8,98	48 h	2
		10,56	48 h	2
		7,99	48 h	2
		6,91	72 h	2
		6,31	24 h	2
		7,48	48 h	1
		5,45	24 h	2
24 horas	4,87		48 h	1
	5,80		48 h	1
48 horas	11,78	10,60	Mesmo dia	1
	12,06	7,94	Mesmo dia	1
	11,47	8,80	Mesmo dia	1
	8,02		Mesmo dia	1

Os steps 1 e 2 referem-se a colocação da quantidade de solvente de 1 só vez (Baumgartner et al., 1979) ou em 2 etapas (Yang et al., 1998).

Observou-se com estes resultados que através do teste de Wilcoxon os valores são considerados significativos e optou-se pela metodologia mais simples com menor manipulação da amostra e com maior tempo de extração (48 horas).

8°. Experimento:

Objetivo: testar um protocolo para extração hormonal em fezes em pêlos e verificar seus resultados.

Metodologia: 50 mg de pêlos cortados em pequenos pedaços foram colocados em um tubo de ensaio (A) com 3 mL de metanol e agitado no vortex por 1 minuto por 2 horas. O tubo foi então colocado em banho maria para fervura a 90°C por 25 minutos (sempre completando a marca inicial da quantidade de metanol no tubo, para que terminasse com a mesma quantidade de solvente todas as amostras) e centrifugado por 15 minutos. Os solventes foram então transferidos para um novo tubo e receberam mais 3mL de solvente e novamente agitado no vortex e centrifugado. O sobrenadante foi seco em ar comprimido e ressuspensionado em 0,2 mL de PBS e 1 mL de metanol (0,9 mL de PBS + 0,1 mL de metanol).

Resultados:

Ressuspensão	Beethoven T ng/g	Skeik T ng/g
PBS	2,97	9,87
metanol	Abaixo da curva	4,83

Os resultados deste teste foram insatisfatório, muito trabalhoso e despendia-se de uma quantidade muito grande de metanol para sua execução, tornando-se impraticável para uma quantidade grande de amostras.

9º. Experimento:

Objetivo: durante a ressuspensão das amostras com 0,2 mL de PBS percebeu-se certa dificuldade para lavar o tubo no vortex, em virtude da pequena quantidade de líquido. Então foi testado ressuspender a amostra com 0,2 e 0,5 mL de PBS.

Metodologia: foi utilizado o protocolo de Yang e Baumgartner modificado: 50 mg de pêlo com 3 mL de metanol por 48 horas. Uma parte das amostras foi ressuspensa com 0,2 mL e outra 0,5 mL de PBS.

Resultados:

Animal	PBS mL	T ng/g
Beethoven	0,2	1,77
Beethoven	0,5	2,38
Sheik	0,2	5,53
Sheik	0,5	10,45

A ressuspensão da amostra com 0,5 mL de PBS lavou melhor o tubo e por conseqüência apresentou melhores resultados.

A partir destes resultados optou-se por utilizar o protocolo mais simples e que extraísse a maior quantidade de hormônio. Portanto chamarei de Protocolo de Baumgartner et al. (1979) e Yang et al. (1998) - modificado, que consiste na seguinte metodologia de extração: 50 mg pêlos cortados com o auxílio de uma tesoura em pequenos pedaços são colocados em tubos de ensaio e adicionados 3mL do solvente metanol e agitados no vortex por 1 minuto. Estes tubos permanecem em descanso na capela em temperatura ambiente por 48 horas, até que sejam agitados novamente no vortex por 1 minuto, e todo o seu componente líquido extraído com auxílio de uma pipeta para um tubo seco. Esta solução é então

seca em fluxo de ar comprimido em banho maria a uma temperatura de aproximadamente 42°C. Os tubos secos serão ressuspensos com 0,5mL de solução tampão gelatina e agitados no vortex até que toda a parede do tubo esteja limpa.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)