UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DETERMINAÇÃO DE METABÓLITOS ESTEROIDAIS PARA ESTUDO DA FUNÇÃO OVARIANA NO BICHO PREGUIÇA (*Bradypus variegatus*)

MÔNICA MÜHLBAUER CARVALHO

RECIFE – PE
2004

MÔNICA MÜHLBAUER CARVALHO

DETERMINAÇÃO DE METABÓLITOS ESTEROIDAIS PARA ESTUDO DA FUNÇÃO OVARIANA NO BICHO PREGUIÇA (*Bradypus variegatus*)

Dissertação submetida ao Programa de Mestrado em Ciências Biológicas, área de concentração em Fisiologia, da Universidade Federal de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

Orientador:
Prof. Dr. Carlos Peres da Costa
Co-orientadora:
Prof[a] Dr[a] Denia P. Fittipaldi Duarte

Recife - PE
2004

MÔNICA MÜHLBAUER CARVALHO

DETERMINAÇÃO DE METABÓLITOS ESTEROIDAIS PARA ESTUDO DA FUNÇÃO OVARIANA NO BICHO PREGUIÇA (*Bradypus variegatus*)

Dissertação submetida ao Programa de Mestrado em Ciências Biológicas, área de concentração em Fisiologia, da Universidade Federal de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

Aprovada em 20 de dezembro de 2004.

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Maria Luiza Martins Aléssio - UFPE

Profª Drª Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim - UFRPE

Prof. Dr. Marcelo de Moraes Valença - UFPE

Para Fabiano, companheiro e amigo, pela compreensão e apoio, com todo meu amor.

Aos meus pais, Henrique e Nelzira, grandes incentivadores dos meus objetivos, a minha gratidão por acreditarem em mim e o meu eterno orgulho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Peres da Costa, pela orientação deste trabalho, pela amizade, carinho, aprendizado, confiança e zelo quando mais precisei. Foram dois anos de convivência que jamais serão esquecidos.

À Profª. Drª. Denia Fittipaldi Duarte, pela co-orientação, pelas valiosas sugestões, críticas, revisão do português, mas, principalmente, pela amizade e alegria que nos anima todos os dias e que, certamente, dará muita saudade.

Ao Prof. Dr. Desmond Gilmore, do Laboratório de Anatomia Humana, da Universidade de Glasgow, Escócia, idealizador deste trabalho, pela disponibilidade na rápida aquisição das referências bibliográficas, pelos ensinamentos endocrinológicos e pela leitura e revisão do inglês.

Aos Profs. Drª. Maria Inês Wanderley e Dr. Daniel Pedro Udrisar pelos ensinamentos na área de endocrinologia e pelas excelentes aulas dadas.

Ao Prof. Dr. Adelmar Afonso de Amorim Júnior, do Departamento de Anatomia, da Universidade Federal de Pernambuco pelos ensinamentos da coleta de sangue em preguiças.

À Profª Drª Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim, do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – Área de Anatomia, da Universidade Federal Rural de Pernambuco pela ajuda na coleta de sangue, pelas críticas valiosas e grande incentivo.

Ao Prof. Dr. Valdir Luna da Silva pela ajuda na análise estatística e pelas sugestões.

A todos os professores do curso de Mestrado em Ciências Biológicas pelos ensinamentos transmitidos.

Aos monitores do Laboratório pela ajuda nas coletas, em especial Rubens Carvalho Filho e Emerson Jardel da Costa.

Aos colegas de turma: Gilberto, Rodrigo, João, Rejane, Pequena, Érika, Érica, Adriano, Daniela, Francimar, Lívia, Indianara, Fernanda, Emileide, Idelfonso e Eduardo pela convivência ao longo do curso.

Aos alunos de iniciação científica Anderson Barbosa de Assis e Hudson Souza pela disposição em sempre colaborar.

Aos funcionários do Departamento pelo apoio.

A todos do Laboratório de Dosagem Hormonal da Faculdade de Veterinária, da Universidade de São Paulo, pela receptividade e, principalmente à técnica Érika Cristina G. Felippe, pela realização das dosagens hormonais e disponibilidade em ajudar.

À Sr^{a}. Maria Luíza B. M. Peres da Costa pelo apoio nas coletas, juntamente com os caseiros, João e Severina, pela grande ajuda nas coletas e pesagens, e pela dedicação para com os animais.

Aos órgãos CAPES e da FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco) pelo apoio financeiro para obtenção dos *Kits* para dosagem hormonal.

Ao IBAMA por permitir a viabilidade deste estudo.

Ao meu tio Otávio, Rose e Nicole Mühlbauer, pela hospedagem e carinho em São Paulo.

A todos amigos do Recife por me “acolherem” nesta cidade.

"Nunca ande pelo caminho traçado,
pois ele conduz somente até onde outros já foram".

Alexander Graham Bell

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo investigar em preguiças (*Bradypus variegatus*) mantidas em cativeiro, os níveis de estradiol (E_2) e progesterona (P_4), através da monitorização fecal de metabólitos destes esteróides, visando obter informações do ciclo estral e da função ovariana nestes animais. Quatro preguiças fêmeas, aparentemente saudáveis, fornecidas pelo IBAMA, foram estudadas. Cada uma exibiu um perfil qualitativo diferenciado: preguiça (PG) 1 (PG1), 3,3 ± 0,1Kg, mostrava-se dócil; PG2, 3,3 ± 0,1Kg, mostrava-se indiferente, sendo trazida pelo IBAMA com filhote desgarrado da mãe, o qual foi a óbito no mesmo dia da chegada; PG3, 2,6 ± 0,4Kg, dócil; PG4, 3,9 ± 0,2Kg, apresentava comportamento agressivo. Após período de uma semana de adaptação ao cativeiro, foram monitorizadas, mantidas em biotérios individuais, por cerca de doze semanas. Durante este período, foram avaliadas, diariamente, quanto ao padrão de defecação e, semanalmente, quanto à variação de peso corporal e temperatura retal. A dosagem dos metabólitos fecais do E_2 e da P_4 foi realizada pela técnica de radioimunoensaio (RIE) em fase sólida, utilizando *kits* desenvolvidos para avaliação quantitativa do E_2 e da P_4 no soro humano. Estes *kits* foram validados para uso em fezes de preguiças através de método de paralelismo de matriz depletada. A validação da técnica de RIE, para dosagem de metabólitos fecais em preguiças, foi realizada através de coletas de amostras sangüíneas, via punção venosa, obtidas sempre no mesmo dia da defecação do animal. Os resultados mostraram correlação direta significativa entre os níveis plasmáticos e fecais do E_2 ($p<0.05$, teste de *Pearson*), validando esta técnica para análise do ciclo estral desses animais. As preguiças defecavam, em média, duas vezes por semana, em dias alternados, diferindo dos dados da

literatura. Das quatro preguiças monitorizadas, foi detectada presença de ovulação em duas, PG3 e PG4, sendo que, na PG4, os níveis dos metabólitos fecais do E_2 e da P_4 apresentavam-se elevados em relação às demais. Concluídas as coletas fecais e dosagens hormonais, os animais permaneceram sob observação nos biotérios para serem liberados pelo IBAMA, sendo constatado que a PG4 pariu um filhote hígido, o que, provavelmente, poderia justificar os altos níveis dos metabólitos hormonais encontrados nesta fêmea. Este trabalho, pioneiro em preguiças (*Bradypus variegatus*), testou e validou uma técnica não-invasiva amplamente utilizada em outros mamíferos, possibilitando, o estudo da sua função ovariana, abrindo perspectivas para futuros estudos do ciclo estral deste interessante animal.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate in sloths (*Bradypus variegatus*), the circulating levels of estradiol (E_2) and progesterone (P_4) by monitoring the fecal metabolites of these steroids to obtain information on the estrous cycle and ovarian function. Four apparently healthy female sloths, supplied by IBAMA (Brazilian Environmental Agency) were studied. Each showed a qualitatively different profile: Sloth SL1 (3.9 ± 0.2 Kg) was docile. Sloth SL2 (3.3 ± 0.1 Kg) was indifferent and was received from IBAMA accompanied with her unattached offspring, that expired on the same day it was brought in. Sloth SL3 (2.6 ± 0.4 Kg) was docile and sloth SL4 (3.9 ± 0,2 Kg) showed aggressive behavior. After a week of adaptation to captivity, the animals were monitored in individual housing over a period of approximately twelve weeks. During this time, they were evaluated daily with regards to the pattern of defecation and weekly for weight and rectal temperature changes. The estimation of fecal metabolites of E_2 and of P_4 was carried out by the technique of radioimmunoassay (RIA) in the solid phase, utilizing kits employed for quantitative evaluation of E_2 and P_4 in human serum. These kits were validated for use with sloth feces by the method of parallelism of depleted matrix. The validation of the RIA for evaluation of fecal metabolites in sloths, was done by collection of blood samples via venous puncture undertaken on the same day as defecation. The results showed a significative direct correlation between the plasma and fecal levels of E_2 ($p<0.05$, Pearson test) validating this technique for analysis of the estrous cycle of these animals. Fecal levels of the metabolites of P_4 were likewise correlated with plasma levels, although the sample number was small and the results can only be regarded as preliminary. The sloths defecated, on an average, twice weekly on alternate days,

differing from data reported in the literature. In the four sloths which were monitored, ovulation was detected in two, SL3 and SL4. In PG4 the levels of fecal metabolites of E_2 and of P_4 were elevated in relation to those in the others. Once the collection of feces and hormonal measurements were carried out, the animals were subsequently kept under observation in their housing until being freed by IBAMA. During this period sloth SL4 gave birth to a healthy offspring, which could explain the high levels of hormonal metabolites found in her feces. This pioneer study in sloths (*Bradypus variegatus*) tested and validated a technique non invasive which is widely used in other mammals making it possible to study ovarian function in sloths and opening perspectives for future studies on the estrous cycle of this interesting animal.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Aspectos da face de *Bradypus variegatus*.....17

FIGURA 2 - Distribuição geográfica das espécies de preguiças do gênero *Bradypus* na América do Sul 18

FIGURA 3 - Aspecto da coloração do dorso de *B. variegatus*, A (fêmea) e B (macho). 21

FIGURA 4 - Preguiçários: A, situado nas vizinhanças do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE; B, situado na granja Ananda em Aldeia, Camaragibe – PE 31

FIGURA 5 - Coleta de amostra sangüínea.....36

FIGURA 6 - Variação de peso das preguiças (PG), *B. variegatus*. A (PG1), B (PG2), C (PG3) e D (PG4).....40

FIGURA 7 - Variação de temperatura retal das preguiças (PG), *B. variegatus*. A (PG1), B (PG2), C (PG3) e D (PG4).....41

FIGURA 8 - Curva de paralelismo, obtida pelo Contador de Radiação Gama (Canberra Packard) utilizado para dosagem de hormônios, para metabólitos fecais do estradiol utilizando a matriz depletada (r= 0,993).....43

FIGURA 9 - Curva de paralelismo, obtida pelo Contador de Radiação Gama (Canberra Packard) utilizado para dosagem de hormônios, para metabólitos fecais da progesterona utilizando a matriz depletada (r= 0,977) 43

FIGURA 10 - Curva de paralelismo, obtida pelo Contador de Radiação Gama (Canberra Packard) utilizado para dosagem de

hormônios, para estradiol plasmático utilizando a matriz depletada (r= 0,997). 44
FIGURA 11 - Curva de paralelismo, obtida pelo Contador de Radiação Gama (Canberra Packard) utilizado para dosagem de hormônios, para progesterona plasmática utilizando a matriz depletada (r = 0,994) 44
FIGURA 12 - Correlação entre estradiol plasmático e metabólitos do estradiol nas fezes de preguiça (*B. variegatus*), para nível de significância de p<0,05 (r = 0,689; F = 7,23; df = 1,8).. 45
FIGURA 13 - Correlação entre a concentração do estradiol plasmático (pg/mL x 100) e os metabólitos do estradiol em fezes (pg/g de fezes úmidas) em preguiça (*B. variegatus*) 45
FIGURA 14 - Níveis hormonais individuais dos metabólitos fecais do estradiol em preguiças (PG), *Bradypus variegatus.* A (PG1), B (PG2), C (PG3) e D (PG4) 47
FIGURA 15 - Sobreposição dos níveis hormonais individuais dos metabólitos fecais do estradiol em preguiças (*B. variegatus*), durante período de monitorização. PG – preguiça 47
FIGURA 16 - Níveis hormonais individuais dos metabólitos fecais da progesterona em preguiças (PG), *Bradypus variegatus.* A (PG1), B (PG2), C (PG3) e D (PG4) 48
FIGURA 17 - Sobreposição dos níveis hormonais individuais dos metabólitos fecais da progesterona em preguiças (*B. variegatus*), durante período de monitorização. PG – preguiça 49

FIGURA 18 - Flutuações dos metabólitos fecais do estradiol e da progesterona na preguiça (*Bradypus variegatus*). Dados obtidos da preguiça 3.....50
FIGURA 19 - Flutuações dos metabólitos fecais do estradiol e da progesterona na preguiça (*Bradypus variegatus*). Dados obtidos da preguiça 4.....50
FIGURA 20 - Filhote da preguiça 4 com dois dias de vida.....51
TABELA 1 - Valores individuais de peso, temperatura retal, número de defecações e dias de observação obtidos em preguiças (*B. variegatus*) 39

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ng	nanograma
g	gramas
pg	picograma
mL	mililitro
ºC	graus Celsius
pH	potencial iônico
^{125}I	iodo radioativo ligado ao hormônio
[ ]	concentração
DP	desvio padrão
IBAMA	Instituto Nacional do Meio Ambiente
PG	preguiça
X	média
UI	Unidade Internacional
Kg	quilograma
NaCl	cloreto de sódio
$NaPO_4$	fosfato de sódio
%	porcentagem
E_2	estradiol
P_4	progesterona

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 16

1.1. Classificação taxonômica das preguiças 16

1.2. Distribuição geográfica do gênero *Bradypus* 17

1.3. Hábitos, comportamento e temperatura do gênero *Bradypus* 18

1.4. Sistema reprodutor e endócrino das preguiças 20

1.5. Avaliação do perfil hormonal por técnicas não-invasivas 25

2. OBJETIVO GERAL 29

2.1. Objetivos Específicos 29

3. MATERIAL E MÉTODO 30

3.1. Animais 30

3.2. Monitoração dos Depósitos Fecais 31

3.3. Processamento das Amostras 32

3.3.1. Preparação das amostras 32

3.3.2. Extração dos metabólitos esteroidais 32

3.4. Dosagens Hormonais 33

3.4.1. Metabólitos do E_2 e da P_4 33

3.4.2. Parâmetros de controle de qualidade dos ensaios hormonais 34

3.4.3. Validação dos *kits* 35

3.4.4. Validação da técnica de dosagem dos metabólitos fecais 35

3.4.4.1. Coleta de amostras sangüíneas 36

3.4.4.2. Dosagem hormonal em amostra sangüínea 37

3.4.5. Determinação das Concentrações dos metabólitos 37

3.5. Análise Estatística 38

4. RESULTADOS 39

4.1. Características dos animais 39

4.2. Dosagens hormonais dos metabólitos esteroidais 42

4.2.1. Diluição 42

4.2.2. Parâmetros de controle de qualidade dos ensaios hormonais 42

4.2.3. Validação dos *kits* 42

4.2.4. Validação da técnica de dosagem dos metabólitos fecais 44

4.3. Níveis dos Metabólitos Fecais 46

4.3.1. Metabólitos do E_2 46

4.3.2. Metabólitos da P_4 48

4.3.3. Flutuações dos metabólitos do E_2 e da P_4 nas PG3 e PG4 49

4.4. Liberação das preguiças 51

5. DISCUSSÃO 52

6. CONCLUSÕES 67

REFERÊNCIAS 68

ANEXO I 77

ANEXO II 78

ANEXO III 79

ANEXO IV 80

1. INTRODUÇÃO

1.1. Classificação taxonômica das preguiças

As preguiças são mamíferos placentários pertencentes, juntamente com o tamanduá e com o tatu, à ordem *Xenarthra*, formalmente conhecida como Edentata, a qual surgiu na América do Sul há cerca de 80 milhões de anos (GOFFART, 1971). Estes animais estão divididos, segundo Wetzel (1985), em duas famílias: *Bradypodidae* (preguiças de três dedos) e *Megalonichidae* (preguiças de dois dedos), com os gêneros *Bradypus* e *Choloepus*, respectivamente. Esses gêneros diferem entre si em aspectos anatômicos e fisiológicos, tais como: comportamento, hábitos, velocidade de movimento e termorregulação. *Bradypus* apresenta-se sob três espécies: *B. tridactylus*, *B. variegatus* e *B. torquatus*, enquanto *Choloepus* apresenta duas: *C. hoffmanni* e *C. didactylus*.

As três espécies do gênero *Bradypus* podem ser identificadas, segundo critérios descritos por Wetzel e Ávila-Pires (1980), a partir da coloração da pelagem e aspectos da face. A espécie estudada neste trabalho é *Bradypus variegatus*, a qual apresenta pelagem mais escura do pescoço, lados da face e em volta dos olhos, formando uma máscara (Figura 1).

FIGURA 1 - Aspectos da face de *Bradypus variegatus* (Fotografia: Mühlbauer Carvalho, M., 2004).

1.2. Distribuição geográfica do gênero *Bradypus*

As preguiças do gênero *Bradypus* ocorrem em praticamente todo o território do Brasil. A espécie *B. torquatus* (preguiça-de-coleira) é mais restrita às florestas costeiras remanescentes da Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro (WETZEL, 1985), mas esta espécie sofreu um decréscimo catastrófico com a destruição da Mata Atlântica no sudeste brasileiro, sendo, segundo Wetzel (1985), a mais ameaçada de extinção. *Bradypus tridactylus* encontra-se apenas no sul da Venezuela, Guianas e norte do Brasil, ao sul do Rio Amazonas (GILMORE et al, 2000), enquanto que *B. variegatus* é a espécie com distribuição mais ampla, estando presente em quase todas as regiões do Brasil (WETZEL, 1982), sendo, freqüentemente, encontrada na região nordeste (Figura 2). Cabral e Lima (2000), em estudos realizados para determinação da mastofauna do estado de Pernambuco, registraram que esta espécie está restrita à zona da Mata.

FIGURA 2 - Distribuição geográfica das espécies de preguiças do gênero *Bradypus* na América do Sul (Desenho reproduzido por Wetzel, 1982).

1.3. Hábitos, comportamento e temperatura do gênero *Bradypus*

As preguiças do gênero *Bradypus* são animais herbívoros, alimentando-se principalmente de folhas e brotos de embaúba (*Cecropia adenops*). Estudos realizados por Montgomery e Sunquist (1978) indicaram que, sob condições de liberdade, estes animais podem alimentar-se de folhas de outras espécies de árvores existentes nas florestas tropicais. Entretanto, em cativeiro alimentam-se basicamente de folhas de embaúba. Assim, após um período de meses, nesta condição, podem sucumbir a uma variedade de infecções aparentemente relacionadas ao comprometimento de seu sistema imunológico; embora haja relatos na literatura de alguns exemplos de preguiças que nasceram e sobreviveram por

considerável período de tempo em estado de semicativeiro (MONTGOMERY e SUNQUIST, 1975; NAGY e MONTGOMERY,1980).

Durante o comportamento alimentar em cativeiro, foi observado que a atividade motora destes animais é reduzida, podendo adormecer enquanto comem (GOFFART, 1971). O bolo alimentar acumula-se no seu sistema digestivo, podendo chegar a 30% do seu peso corporal. Além disso, Montgomery e Sunquist (1975) e De La Fuente (1979 apud DINIZ et al. 1999)[1], afirmaram que o bolo alimentar demora cerca de oito dias para percorrer todo o trato digestivo, período em que a preguiça desce ao solo para defecar e urinar. Esta retenção de fezes e urina, por muitos dias, reduz a necessidade desses animais de descerem regularmente das árvores para eliminar suas excretas e, em conseqüência, diminui o risco de exposição aos predadores.

As preguiças apresentam movimentos lentos (EISENBERG, 1989 apud TAUBE et al., 2001)[2] e passam grande parte de suas vidas mantendo um tônus flexor e uma postura bastante curiosa. Richter e Bartemeier (1926) descreveram importantes observações acerca do aspecto postural do gênero *Bradypus*. Embora esses animais apresentem-se algumas vezes suspensos em galhos de árvores, a postura mais comumente adotada, tanto em cativeiro como em liberdade, é a sentada. Nesta posição os membros posteriores do animal mantêm-se fletidos e agarrados ao tronco da árvore, sentado na forquilha, com o tórax ereto e os membros anteriores cruzados por diante do peito e a cabeça mergulhada entre eles (BEEBE, 1926; LANGWORTHY, 1935; BRITTON, 1941).

Segundo Goffart (1971), diversos autores sugeriram que as preguiças são animais solitários e territoriais, passando, praticamente, suas vidas inteiras nas

---

[1] DE LA FUENTE, F. R. A Fauna – Vida e Costumes dos Animais Selvagens. v. 8. Salvat Editora do Brasil Ltda, Rio de Janeiro, 1979.

[2] EISENBERG, J. F. **Mammals of the Neotropics.** University of Chicago Press, Chicago, 1989.

árvores. Porém, estudos posteriores, realizados por Montgomery e Sunquist (1975), demonstraram que elas regulam seu espaçamento territorial através de pistas químicas e auditivas, parecendo, entretanto, não defender territórios.

Diferente de muitos mamíferos, as preguiças são animais sensíveis a alterações da temperatura ambiente, só conseguindo manter-se aquecidas nos trópicos (GOFFART, 1971). Sua temperatura retal varia de acordo com as mudanças ambientais, apresentando uma média de 32ºC, inferior, portanto, à maioria dos mamíferos (OZÓRIO DE ALMEIDA e BRANCA DE FIALHO, 1924; GOFFART, 1971). Tal labilidade de temperatura ajuda a conservar energia (GILMORE e DA COSTA, 1995). Segundo McNab (1985), sua baixa temperatura corporal associada à baixa taxa metabólica basal parece estar diretamente relacionada à reduzida massa muscular que esses animais apresentam, refletindo, em parte, adaptações para uma vida sedentária nas árvores e incapacidade de produzir calor suficiente para manutenção da temperatura corporal.

1.4. Sistema reprodutor e endócrino das preguiças

Em função da presença de dimorfismo sexual na coloração dorsal das preguiças adultas (Figura 3), aparentemente é fácil diferenciar os sexos (BRITTON 1941). Segundo Beebe, 1926, os machos do gênero *Bradypus* apresentam no dorso uma mancha em forma de “cela” com um padrão de coloração alaranjada e branca, com uma linha central preta; na fêmea, a mesma região não apresenta coloração específica, exceto por possuir uma linha mediana preta. Contudo, em estudos realizados por Duarte (observações não publicadas, 1982), utilizando-se deste parâmetro para identificação do sexo, foi constatado que uma preguiça, identificada

macho, pariu um filhote. Este fato sugere que a diferenciação sexual deve ser realizada pela associação da coloração do dorso do animal reforçada pela visualização do seu órgão sexual, isto é, da sexagem do mesmo.

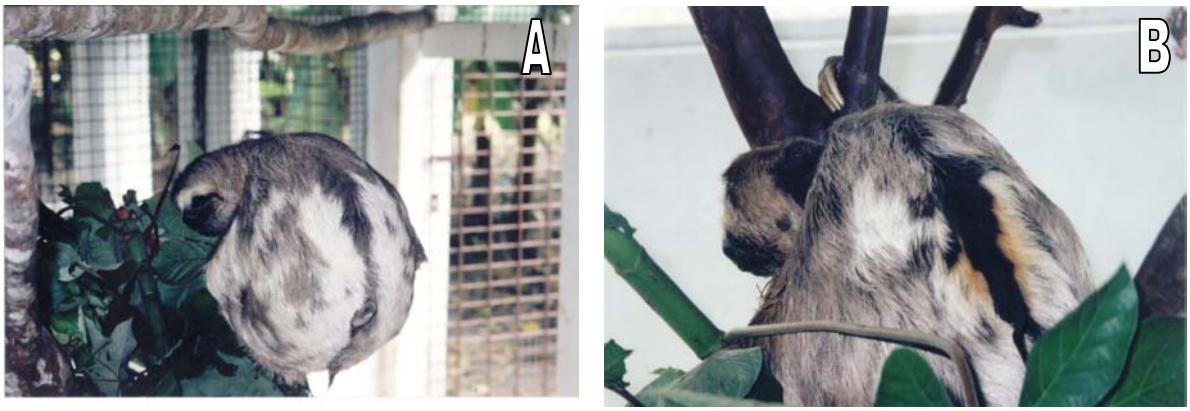

FIGURA 3 – Aspecto da coloração do dorso de *B. variegatus*, A (fêmea) e B (macho). (Fotografia: Mühlbauer Carvalho, M., 2004).

Britton (1941) acredita que essa mancha apareça somente com poucas semanas de vida e Wislocki (1928) afirma que o animal já nasce com ela, mas o desenho definitivo desenvolve-se apenas no macho na puberdade.

No entanto, é difícil determinar o sexo de uma preguiça a partir do exame de sua genitália externa. A genitália de ambos os sexos é pequena e internalizada e com íntima relação com o orifício retal, sendo, porém, separada dele por uma fina camada de pele (MCCRANE, 1966 apud GOFFART, 1971)[3]. A genitália masculina é anterior ao orifício retal e aparece, no adulto maduro, como uma pequena protuberância com diâmetro aproximado de 13mm. Na extremidade da protuberância há uma abertura arredondada muito pequena, a uretra. O pênis não pode ser exteriorizado completamente e apresenta-se rudimentar, consistindo de um pequeno par de corpos cavernosos; não existindo corpo esponjoso verdadeiro (WISLOCKI, 1927 apud GOFFART, 1971; GRASSÉ, 1955)[4]. Tanto nas preguiças de

[3] MCCRANE, M. P. Birth, behavior and development of a hand-reared two-toed sloth (*Choloepus didactylus*). **Internacional Zoologica Yearbook**, v. 6, p. 153-163, 1966.

[4] WISLOCKI, G. B. On the placentation of the tridactyl sloth (*Bradypus griseus*) with a description of some characters of the fetus. **Carnegie Institute of Washington Publication**. n. 380, Contrib. to Embryology, v. 19, n. 105, p. 209-227, 1927.

dois, quanto nas de três dedos, os testículos esféricos são intra-abdominais e as terminações caudais dos epidídimos são unidos através da linha média por uma densa faixa de tecido conectivo (WISLOCKI, 1928). As células de Leydig, no tecido intersticial, são em geral comparáveis às de outros mamíferos. A próstata é circunscrita pelo músculo uretral e representada por uma grande massa de tecido glandular situada entre a bexiga e as aberturas do vaso deferente (WISLOCKI, 1928).

Na fêmea, a genitália externa está intimamente relacionada à abertura retal e a protuberância é menor, com a fenda ao longo de seu comprimento (WISLOCKI, 1928). Raramente a vagina é dupla no seu terço inferior e possui duas aberturas estreitas, as quais, às vezes, são completamente seladas por uma membrana (WISLOCKI, 1927 apud GOFFART, 1971; WISLOCKI, 1928)[5]. Externamente ao esfíncter anal, e encoberto dentro da bolsa cloacal, se encontram duas dobras de pele com aberturas semelhantes a fendas de aproximadamente 1cm de comprimento. No lúmen dessas dobras, é encontrada uma substância gordurosa esbranquiçada secretada por um certo número de glândulas que se abrem nas mesmas. Os ovários do gênero *Bradypus* são bilobulados com os oviductos curvados para cada lado. Os ovários contêm folículos em estágios variáveis de desenvolvimento e, às vezes, um corpo lúteo é evidente (WISLOCKI, 1927 apud GOFFART, 1971**;** WISLOCKI, 1928)[6].

Segundo Goffart (1971), vários autores descreveram que o útero das preguiças é um órgão simples em forma de pêra, sem trompas uterinas, e aplanado no sentido ântero-posterior, que possibilita o desenvolvimento de um ou dois filhotes

[5] WISLOCKI, G. B. On the placentation of the tridactyl sloth (*Bradypus griseus*) with a description of some characters of the fetus. **Carnegie Institute of Washington Publication**. n. 380, Contrib. to Embryology, v. 19, n. 105, p. 209-227, 1927.

[6] Ibidem, p. 209-227.

por gestação (DAUBENTON, 1765 apud GOFFART, 1971; KLINCKOWSTRÖM, 1895 apud GOFFART, 1971; WISLOCKI, 1927 apud GOFFART, 1971; WISLOCKI, 1928)[7,8,9].

Embora as preguiças de dois e de três dedos representem um dos mamíferos mais encontrados nas florestas das Américas Central e do Sul, existe pouca informação sobre a sua função reprodutora, especialmente, no que diz respeito à preguiça de três dedos do gênero *Bradypus.* Esta falta de informação limita os esforços implementados com a finalidade de deter a diminuição de sua população, que prossegue em ritmo acelerado devido à expansão agropecuária e urbana.

Em preguiças, pouco é conhecido sobre o cortejo sexual, o acasalamento, a duração do ciclo estral e da gravidez e o intervalo entre os partos. Não existe concordância na literatura se o acasalamento em *Bradypus* ocorre durante um determinado período de épocas secas do ano, antes das chuvas, como sugerido por Wislocki (1928), bem como por Heuser e Wislocki (1935), ou se esses animais se reproduzem durante todo o ano (GILMORE et al., 1994).

Em *B. variegatus* parece haver uma reprodução sazonal definida, mas um tanto irregular, que varia de acordo com as variações climáticas em diferentes localizações e entre os anos (TAUBE et al, 2001). Tem-se questionado também se todos os machos estão ativos para a reprodução durante toda vida adulta (TOYAMA et al., 1990), ou se este comportamento ocorre, em uma determinada

---

[7] DAUBENTON, L. Description de l'unau, In: BUFFON'S Historie Naturelle Générale et Pariculière, avec la Description du Cabinet du Roi, **Imprimerie Royale.** Paris, v.13, p. 49-59, 1765.

[8] KLINCKOWSTRÖM, A. Beiträge zur vergleichenden Anatomie der Geschlechtsorgane der Edentaten. **Zoologische Jahrbucher** (Abteilung für Anatomie und Ontogenie), v.8, p. 500-543, 1895.

[9] WISLOCKI, G. B. On the placentation of the tridactyl sloth (*Bradypus griseus*) with a description of some characters of the fetus. **Carnegie Institute of Washington Publication**. n. 380, Contrib. to Embryology, v. 19, n. 105, p. 209-227, 1927.

população de adultos, apenas durante um período específico do ano (GILMORE et al., 1994).

A maturação sexual da preguiça é um processo bastante lento; tem sido relatado que a preguiça de três dedos pode levar até seis anos para alcançar a maturidade (GOFFART, 1971). Em cativeiro, as preguiças fêmeas de dois dedos não se reproduzem até os três anos de idade e os machos alcançam a maturidade sexual somente com quatro ou cinco anos de idade (GOFFART, 1971).

Existem na literatura controvérsias quanto à fertilidade da preguiça macho de três dedos, *B. variegatus*. Um estudo realizado na Costa Rica por Toyama *et. al*. (1990) sugere que os machos estão férteis durante todo o ano. Contudo, trabalhos recentes realizados em Pernambuco, têm indicado que, enquanto a reprodução pode ocorrer durante todo o ano, somente uma minoria das preguiças do sexo masculino, dessa espécie, aparenta ser fértil e sexualmente ativa em um dado período do ano (GILMORE et al., 1994; GILMORE e DA COSTA, 1995). Estes estudos envolveram dosagens hormonais combinadas com utilização de microscopia ótica e eletrônica do tecido gonadal. Os túbulos seminíferos da maioria dos animais examinados encontravam-se pouco desenvolvidos. Embora tenham sido observados, ocasionalmente, espermatozóides maduros, havia ausência do ciclo espermatogênico, tornando-as inférteis. Além disso, em duas preguiças, nas quais espermatogênese ativa foi observada, níveis de testosterona circulante muito baixos foram encontrados.

Foi sugerido por Taube et al (2001) que, pelo fato das preguiças de três dedos terem uma dieta altamente especializada e serem dependentes de variações sazonais, na presença de abundância de seu alimento preferido, a reprodução sazonal é limitada para períodos de maior demandas energéticas da gravidez e da

lactação. Além disso, a reprodução sazonal associada com a alta densidade populacional, poderia maximizar, nesses animais solitários, a oportunidade de encontros sexuais nesses períodos (TAUBE et al, 2001).

Em estudos prévios, investigando os fatores que regulam a secreção dos hormônios envolvidos na reprodução em *B. variegatus*, Gilmore et al. (1991) demonstraram que a adenohipófise responde à administração exógena do Hormônio Liberador do Hormônio Luteinizante (LHRH) por aumento acentuado na secreção do Hormônio Luteinizante (LH). Isso, por sua vez, leva a um aumento significativo nos níveis de testosterona circulante. Ainda nestes estudos, foi possível também detectar o LH e a Prolactina na preguiça, usando técnicas de radioimunoensaio.

A duração da gestação é incerta em preguiças de três dedos, mas tem sido, há tempos, estimada como sendo entre seis e oito meses em *B. variegatus*, com um ano de intervalo entre os nascimentos (GOFFART, 1971). Estimativas mais recentes da duração da gestação são, entretanto, de apenas cerca de seis meses (TAUBE et al, 2001).

A baixa taxa de reprodução em preguiças, especialmente do gênero *Bradypus*, é preocupante. Nos dias atuais, estudos visando compreender os mecanismos envolvidos no ciclo reprodutivo desses animais tornam-se essenciais para a criação de um programa destinado à conservação de tal espécie.

1.5. Avaliação do perfil hormonal por técnicas não-invasivas

A maioria dos métodos utilizados para avaliar os níveis de esteróides gonadais requer a coleta de sangue, seguida de separação do plasma (SCHWARZENBERGER et al., 1996; VOS et al., 1999). Em preguiças, este

procedimento foi realizado através da canulação de vasos sangüíneos, por Gilmore e Da Costa (1995), para coleta de sangue, uma vez que, nesses animais, a punção de vasos periféricos é difícil pela presença da *rete mirabile,* existente nos seus membros. Sugere-se que a *rete mirabile* tem diversas funções, tais como: reservatório sangüíneo; um sistema de contra-corrente, que parece representar um mecanismo periférico de conservação de calor (SCHOLANDER e KROG, 1957); ou um sistema facilitador do retorno de sangue para o coração, o qual poderia ser extremamente importante para as preguiças, uma vez que; por possuírem longos períodos de contração muscular sustentada, reduziriam assim, o risco de desenvolverem trombose venosa profunda (BAZETT et al., 1948 apud GOFFART, 1971)[10]. A canulação de vasos implica em um processo cirúrgico com manutenção de um cateter patente, risco de formação de coágulos, submetendo o animal ao estresse, que poderia acarretar em alterações hormonais e até mesmo, afetar sua fertilidade (COUBROUGH, 1985; DOBSON e SMITH, 2000;), falseando, assim, os resultados de dosagens hormonais.

Com ênfase na biologia da conservação, qualquer método não invasivo que permita um melhor entendimento da função reprodutora numa dada espécie, torna a proposta de pesquisa extremamente atraente. O método predominantemente não invasivo, utilizado para monitorizar o estado endócrino em diferentes animais, tem sido via uroanálise. As medidas dos metabólitos hormonais utilizando este método têm fornecido informações valiosas da função ovariana e da gravidez numa grande variedade de animais (WHITTEN et al., 1998). Este, porém, acaba por restringir-se a algumas espécies, em face da dificuldade da coleta de urina. Em preguiças, a

[10] BAZETT, H. C.; MENDELSON, E. S.; LOVE, L.; LIBET, B. Precooling of blood in the arteries, effective heat capacity and evaporative cooling as factors modifying cooling of the extremities. **Journal of Applied Physiology**, V. 1, p. 169-182, 1948.

utilização da uroanálise encontrou limitações metodológicas em função da peculiaridade da genitália das fêmeas, dificultando a coleta de urina via sonda uretral. Além disso, este procedimento imporia contato direto do pesquisador com o animal com sua contenção, gerando estresse.

Recentemente, a análise fecal de metabólitos hormonais também vem sendo utilizada como uma abordagem adicional ou alternativa para as técnicas de avaliação da função endócrina. Ela tem sido utilizada para detectar alterações no estado reprodutivo de um grande número de animais, incluindo animais de laboratório como camundongos (MUIR et al., 2001), animais domésticos como gatos (BROWN et al., 1993 e 1994), cães (GUDERMUTH et al., 1998; HAY et al., 2000), ovelhas (BORJESSON et al., 1996) e porcos (SANDERS et al., 1994), e animais selvagens, tanto em cativeiro: tigres (BROWN et al., 1996), antílopes (THOMPSON et al., 1998), vários primatas (WASSER et al., 1988; SHIDELER et al., 1993; HEISTERMANN et al., 1993; ZIEGLER, et al., 1996 e 1997; JURKE et al., 1997; SOUSA e ZIEGLER, 1998; MATSUMURO et al., 1999; CAMPBELL et al., 2001; BARRET et al., 2002), rinocerontes (TURNER et al., 2001), hipopótamos (GRAHAM et al., 2002), hienas (GOYMANN et al., 1999), ursos (ONUMA et al., 2002; ISHIKAWA et al., 2002); como em liberdade: diferentes primatas (WASSER et al., 1991; WASSER, 1996; CAROSI et al., 1999; FUJITA et al., 2001; ALBUQUERQUE et al., 2001; LYNCH et al., 2002; MOORMAN et al., 2002); veados (KAPKE et al., 1999; LI et al., 2001), tigres e leopardos (CZEKALA et al., 1994; MOREIRA et al., 2001), elefantes africanos (WASSER et al., 1996; FIESS et al., 1999) e rinocerontes (SCHWARZENBERGER et al., 2000).

Investigações da função reprodutora, através de dosagens hormonais séricas, foram realizadas por Gilmore et al. (1994) e por Gilmore e Da Costa (1995) em *B.*

variegatus machos. Nestes estudos foram coletadas amostras de sangue após canulação da veia jugular interna, sob anestesia local com xilocaína, permanecendo os animais retidos, o que, sem dúvida, pode ter gerado estresse pela contenção e ainda, no final do procedimento, os animais foram sacrificados para posterior análise do tecido gonadal.

Utilizar técnicas não invasivas com o objetivo de realizar dosagens hormonais em *B. variegatus*, através de amostras fecais, além de permitir maior compreensão de seu perfil hormonal, sem a interferência direta da manipulação do pesquisador, torna-se um método vantajoso, uma vez que a coleta não invasiva deste material é extremamente simples, não sendo necessário manuseio nem sacrifício dos animais.

Pelo exposto, visando determinar a ocorrência e a duração do ciclo estral em preguiças fêmeas, foi realizada coleta de amostras fecais em *B.variegatus*, por um período de, no mínimo, três meses, para dosagens dos níveis dos metabólitos do estradiol (E_2) e dos metabólitos da progesterona (P_4). Estas dosagens permitiram avaliar como esses metabólitos hormonais variam ao longo do tempo, possibilitando determinar as flutuações hormonais que ocorreram a cada mês de monitorização, e se existe ocorrência ou não de ovulação. Estes resultados visam contribuir ao estudo do ciclo reprodutivo desses interessantes animais.

2. OBJETIVO GERAL

Estudar a função ovariana em preguiças (*B. variegatus*), em condições de cativeiro, através da monitorização fecal dos metabólitos dos esteróides gonadais, ao longo de, no mínimo, doze semanas.

2.1. Objetivos Específicos

- Validar a dosagem de metabólitos esteroidais em amostras fecais;
- Determinar os níveis dos metabólitos do estradiol (E_2) e da progesterona (P_4) nas fezes por um período de, no mínimo, doze semanas;
- Investigar as características da função ovariana, visando determinar a ocorrência do ciclo estral.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Animais

Foram utilizadas quatro preguiças fêmeas (*Bradypus variegatus*), pesando 2,7 a 3,9Kg (3,3 ± 0,5 Kg), denominadas preguiça 1 (PG1), preguiça 2 (PG2), preguiça 3 (PG3) e preguiça 4 (PG4). Os estudos foram realizados entre março de 2003 e abril de 2004.

Os animais, provenientes da região metropolitana do Recife, fornecidos pelo IBAMA (Processo nº 02019.002944/02-74) ao Laboratório de Fisiologia Cardiopulmonar, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, no Recife – PE, foram, inicialmente, sexados, identificados, pesados e avaliados quanto ao seu estado de higidez por meio dos seguintes parâmetros: avaliação e inspeção da pelagem e dedos, grau de atividade motora e tomada da temperatura retal. A PG1 foi mantida no biotério (preguiçário) construído nas vizinhanças do referido Departamento (Figura 4A). As demais foram transportadas à Granja Ananda, situada em Aldeia, Camaragibe - PE, onde foram mantidas, individualmente, em preguiçários (Figura 4B). Todas permaneceram no cativeiro, durante uma semana, para que pudessem adaptar-se, antes do início da coleta das amostras fecais. Os preguiçários consistiam em áreas individuais de cerca de $4m^2$ com paredes em alvenaria e telas que permitiam aos animais adequadas condições de visão, ventilação e iluminação. O piso do preguiçário possuía um tronco de madeira, fixado centralmente, com galhos onde os animais podiam permanecer sentados ou suspensos (Figura 4 - A e B).

FIGURA 4 – Preguiçários: A - situado nas vizinhanças do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE; B - situado na granja Ananda em Aldeia, Camaragibe - PE (Fotografia: Mühlbauer Carvalho, M., 2004).

Duas vezes ao dia, foram oferecidas folhas frescas de embaúba (*Cecropia adenops*) em horários aleatórios e água *ad libitum.* Os animais foram observados diariamente com relação à atividade motora, tomada de alimento e defecação e, semanalmente, temperatura retal e peso corporal aferidos sempre no horário compreendido entre às 12h e 17h 59 (período da tarde).

3.2. Monitoração dos Depósitos Fecais

A coleta de fezes, formada por uma massa composta de *pellets* individuais, foi realizada nos dias em que os animais defecavam, sendo acondicionadas em sacos plásticos do tipo *Zip-lock*, identificadas com o nome do animal, data e horário da defecação.

As amostras foram conservadas em freezer a -20^{o}C, até o descongelamento para realização do processo de extração hormonal. O estudo foi realizado utilizando amostras fecais coletadas de cada animal durante um período de, no mínimo, doze semanas.

Os níveis dos metabólitos dos esteróides foram dosados por meio do método de extração de esteróides e radioimunoensaio (RIE).

3.3. Processamento das Amostras

3.3.1. Preparação das amostras

As amostras fecais coletadas foram descongeladas, pesadas e as medidas dos níveis dos metabólitos hormonais processadas no Laboratório de Dosagens Hormonais, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP.

As amostras foram dosadas em duplicata.

3.3.2. Extração dos metabólitos esteroidais

As amostras fecais foram analisadas para determinação dos metabólitos do E_2 e da P_4 de acordo com o método descrito por Brown et al. (1994). Em tubos de ensaio de vidro (12 mL), devidamente identificados, foram pesadas (balança Marte – modelo AL 500) alíquotas de 0,3 g de fezes úmidas, ao qual foram adicionados 5 mL de etanol (Etanol, P.A.- Merck) a 90%. Com auxílio de bastão de vidro, as fezes foram trituradas e turbilhonadas no aparelho Vortex (Phoenix, modelo AT 56), por 30 segundos. Em seguida, o material foi, dentro de uma capela, aquecido a 90^{o}C em banho-maria, permanecendo por 20 minutos, após iniciada a fervura. Durante esse tempo, o etanol evaporado foi sendo gradativamente reposto para que nenhuma amostra ficasse seca. Após a fervura, o volume final em cada tubo foi de 5 mL. O

material foi então, centrifugado a 500 g por 15 minutos (QUIMIS modelo Q-222). Ao final, o sobrenadante foi transferido para tubos de ensaio limpos. O *pellet* resultante desta primeira centrifugação foi homogeneizado em 5 mL de etanol 90%, sendo agitado por 30 segundos e novamente centrifugado a 500 g por 15 minutos. Os dois sobrenadantes foram, então, combinados em um único tubo e secos por completo com fluxo de ar comprimido (MSI 5,2 mL/100) com banho-maria (LÁCTEA – modelo desenvolvido pelo Laboratório de Dosagens Hormonais, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo - USP, São Paulo, SP). O extrato seco resultante foi reconstituído em 1 mL de metanol (Metanol, P.A. – Merck), por meio de agitação no aparelho Multi Vortex (VWR Scientific products, multitubos VX-2500), por 10 minutos. Os extratos foram transferidos para tubos plásticos (*eppendorfs*) devidamente identificados e as amostras foram diluídas em solução tampão para RIE contendo: $NaPO_4$ (13,8 g); NaCl (9,0 g); azida sódica (1,0 g), para evitar a degradação dos esteróides pelas enzimas bacterianas; gelatina (1,0 g) e água destilada (1000 mL), em pH 7,0. A diluição das amostras variaram em proporções de 1/5, 1/20 e 1/40 para serem dosadas.

3.4. Dosagens Hormonais

3.4.1. Metabólitos do E_2 e da P_4

Para dosagem dos metabólitos fecais do E_2 e da P_4 de *B. variegatus* foi utilizada a técnica de RIE em fase sólida, por meio do *kit* (COAT-A-COUNT, Diagnostic Products Corporation - DPC MEDLAB®, Los Angeles, CA, USA)

desenvolvido para avaliação quantitativa do E_2 e da P_4 no soro humano. Esses *kits* de fase sólida utilizam como elemento traçador o hormônio marcado com ^{125}I e apresentam pouca reação cruzada com os metabólitos específicos para cada hormônio estudado.

Como antisoro, os *kits* apresentam tubos recobertos com anti-E_2 e anti-P_4 extraídos de coelhos; sendo a sensibilidade mínima detectada no Contador de Radiação Gama – Packard-Cobra Auto-Gamma counter (Canberra Company) – utilizado para dosagem de hormônios.

3.4.2. Parâmetros de controle de qualidade dos ensaios hormonais

O controle de qualidade dos ensaios de RIE foi realizado através da análise dos coeficientes de variação (CV) intra e interensaios e da determinação da sensibilidade dos ensaios hormonais. Foram determinados 10 ensaios para as dosagens hormonais de cada hormônio pesquisado. Para verificação do CV, foi utilizado um *pool* de amostras fecais em todos os ensaios hormonais.

O monitoramento da eficiência da extração, por meio da recuperação fria (R), foi realizado adicionando-se, `a matriz depletada, valores conhecidos de hormônio padrão em algumas amostras que já haviam sido dosadas anteriormente. Após a extração dessas amostras enriquecidas com hormônios, foi realizada a diferença entre a quantidade adicionada e a quantidade lida no aparelho.

3.4.3. Validação dos *kits*

A validação dos *kits* DPC MEDLAB® para uso em extrato de fezes de preguiças fêmeas foi realizada pelo método de paralelismo, utilizando matriz depletada. Este método indica se metabólitos do extrato da espécie estudada estão interagindo com o anticorpo do *kit* de forma similar ao hormônio usado como padrão.

A depleção hormonal de um *pool* de amostras foi realizada com uma solução de carvão-dextran (DARBRE et al., 1983; REDDEL et al., 1984). A essa matriz depletada adicionamos valores conhecidos dos hormônios padrões, com diluições que se aproximavam dos pontos da curva padrão dos *kits*. Com esta diluição construímos uma curva correlacionando estes valores. Os resultados foram analisados por Regressão Simples, plotados e o coeficiente de correlação determinado.

3.4.4. Validação da técnica de dosagem dos metabólitos fecais

A fidelidade do perfil hormonal, dosado pelos metabólitos fecais, pode ser validada pela correlação dos níveis hormonais dosados destes com os dosados em amostras sangüíneas. Assim, um dos objetivos deste estudo, foi comprovar que esta técnica não-invasiva, muito utilizada atualmente em diferentes espécies, é de confiabilidade para a dosagem de hormônios gonadais nas preguiças. A dificuldade de um procedimento cirúrgico, como a canulação de vasos sangüíneos, com todos os problemas que poderia acarretar, como descrito anteriormente, incentivou o aprendizado de uma técnica de punção venosa que dispensa tal processo cirúrgico. Com a ajuda dos Profs. Dr. Adelmar Afonso de Amorim Júnior, do Departamento de

Anatomia, da Universidade Federal de Pernambuco, e da Drª. Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim, do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – Área de Anatomia, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no Recife, Pernambuco, e baseando-se nos trabalhos de Wallace e Oppenheim (1996) e Vogel et al. (1999), que puncionaram a veia medial da área antecubital em preguiças *Choloepus hoffmanni*, foi possível puncionar a veia cefálica localizada entre os músculos peitoral maior e detóide, no membro anterior de preguiças (*B. variegatus*).

3.4.4.1. Coleta de amostras sangüíneas

Para a validação das dosagens dos metabólitos fecais, realizou-se, aleatoriamente, coleta de amostra sangüínea, sendo a mesma sempre realizada no mesmo dia da defecação do animal para, através de dosagens plasmáticas dos hormônios esteroidais, os níveis hormonais fecais e sangüíneos foram correlacionados. As coletas foram realizadas sem uso de anestesia, após assepsia do membro anterior com álcool a 70% e uso de garrote (Figura 5). Cerca de três mililitros de sangue foram coletados em cada punção venosa.

FIGURA 5 – Coleta de amostra sangüínea (Fotografia: Mühlbauer Carvalho, M., 2004).

A amostra sangüínea foi envasada em um tubo contendo 0,1 mL de heparina (20 UI/mL - Liquemine®, Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos) e o plasma separado por centrifugação a 3000 rpm (Centrifugador Excelsa 2 – FANEM Ltda – modelo 205N – Brasil), por 10 minutos. O plasma foi preservado em microtubos (*eppendorfs*) e armazenado em freezer a -20^{o}C até realização das dosagens hormonais.

3.4.4.2. Dosagem hormonal em amostra sangüínea

As amostras plasmáticas foram descongeladas e as medidas dos níveis do E_2 e da P_4 processadas no Laboratório de Dosagens Hormonais, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP.

Para dosagem do E_2 no plasma de *B.variegatus*, o *kit* utilizado foi 3^{o} Generation Estradiol RIA, da Diagnostic Systems Laboratories, Inc, Webster, Texas, USA, o qual também utiliza como elemento traçador o hormônio marcado com ^{125}I e, como anti-soro, o anti-E_2 extraído de coelhos. Este *kit* apresenta sensibilidade de 0,6 pg/mL.

A dosagem de P_4 plasmática foi realizada utilizando o mesmo *kit* de fase sólida para a dosagem dos metabólitos da P_4.

3.4.5. Determinação das Concentrações dos metabólitos

As concentrações dos metabólitos do E_2 e da P_4 nas fezes determinadas por RIE, expressas em pg/mL para E_2 e em ng/mL para P_4, foram calculadas conforme equação a seguir, desenvolvida pelo Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira,

Laboratório de Dosagens Hormonais, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP), e os resultados obtidos expressos em pg/g de fezes úmidas e ng/g de fezes úmidas, respectivamente.

$$C = \frac{C_o \times Vfe \times D \times [1 + (1 - R)]}{P_o}$$

Onde,

C = Concentração final do metabólito dosado;
C_o = Concentração inicial fornecida pelo RIE;
Vfe = Volume das fezes ao final da etapa de extração;
D = Diluição empregada, a qual foi determinada para os metabólitos do E_2 e da P_4 conforme item 3.3.2;
R = Taxa de recuperação fria obtida para cada hormônio extraído;
P_o = Peso inicial da amostra.

3.5. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada através da utilização do programa STATISTICA para Windows 5.0.

A análise da variação do peso corpóreo, ao longo do período de monitorização dos animais, foi realizado através do teste *t* de *Student* para dados pareados.

A correlação entre os níveis plasmáticos do E_2 e da P_4 e os metabólitos fecais destes hormônios foi realizada através do teste de *Pearson*.

Nível de significância para $p<0.05$ foi considerado em ambos os testes.

A validação dos kits foi realizada através de análise de regressão linear expressa por sua respectiva equação.

4. RESULTADOS

4.1. Características dos animais

No período de adaptação ao preguiçário, isto é, na primeira semana em que foram monitorizadas, as preguiças nos primeiros dias, adotavam a posição sentada na forquilha do tronco da árvore, com os membros anteriores cruzados no peito e a cabeça mergulhada entre eles, permanecendo nessa postura por horas sem se alimentar, defecar ou urinar e sem reagir à presença ou toque humano. Em torno do terceiro dia, as mesmas exploravam o ambiente, alimentavam-se adequadamente, aparentando estarem adaptadas ao cativeiro.

Embora as preguiças estudadas no presente trabalho se apresentassem aparentemente saudáveis, cada uma exibiu um perfil qualitativo diferenciado: PG1 mostrava-se dócil; PG2 mostrava-se indiferente, sendo trazida pelo IBAMA com filhote, o qual foi a óbito no mesmo dia da chegada; PG3 dócil; PG4 apresentava comportamento agressivo.

A Tabela 1 mostra os valores individuais de peso, temperatura retal média, número total de defecações e sua freqüência semanal, e número de dias de observação dos animais, após período de adaptação de uma semana.

TABELA 1 – Valores individuais de peso, temperatura retal média, número de defecações e sua freqüência semanal, e dias de observação obtidos em preguiças (*B. variegatus*).

ANIMAL (n = 4)	PESO MÉDIO (kg)	TEMPERATURA RETAL MÉDIA (ºC)	NÚMERO DE DEFECAÇÕES	FREQÜÊNCIA DE DEFECAÇÃO POR SEMANA	NÚMERO DE DIAS OBSERVADOS
PG1	3,3 ± 0,1	33 ± 1	65	2,5	184
PG2	3,3 ± 0,1	31 ± 2	42	2,1	143
PG3	2,6 ± 0,4	31 ± 2	62	2,1	143
PG4	3,9 ± 0,2	31 ± 2	38	2,9	94
X ± DP	3,3 ± 0,5	32 ± 1	52 ± 14	2,4 ± 0,4	141 ± 37

Valores expressos como médias ± DP.

Os anexos I, II, III e IV mostram os dados do horário em que a defecação ocorreu, os níveis de temperatura retal e peso corporal, quando aferidos, para as preguiças 1, 2, 3 e 4, respectivamente, durante os meses de monitorização. Analisando esses resultados, observa-se que, conforme mostrado nos anexos, embora as preguiças defequem tanto pela manhã (6h – 11h59) como pela tarde (12h – 17h59), há um predomínio de defecarem no horário da manhã.

A Figura 6 mostra o comportamento individual da variação de peso corporal, ao longo do período de observação dos animais.

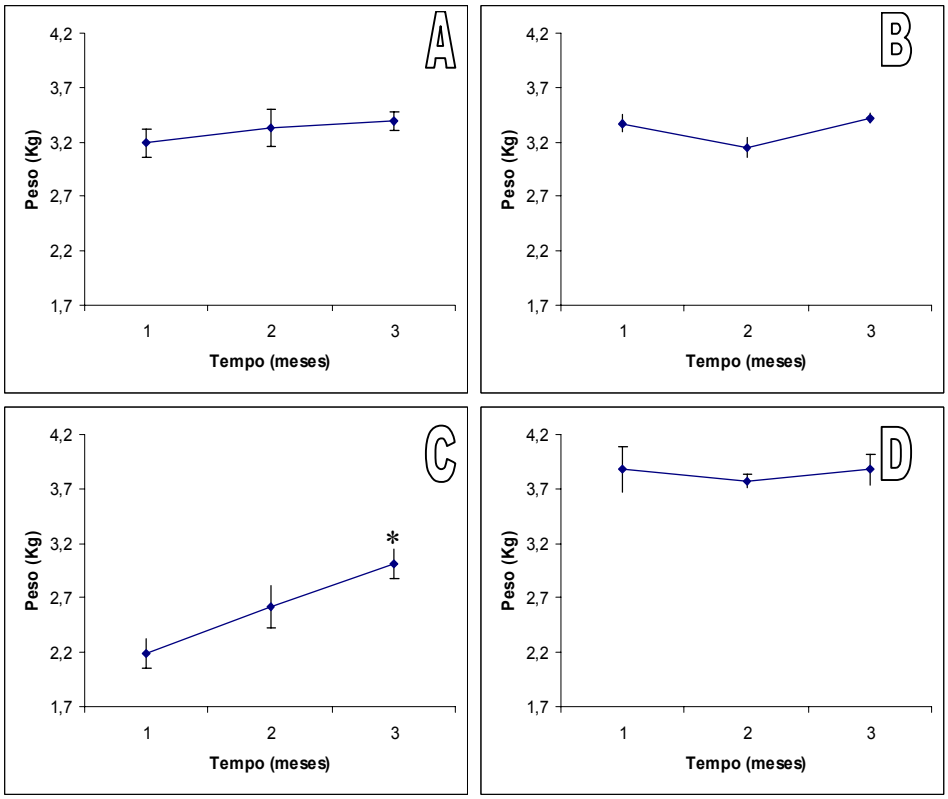

FIGURA 6 – Variação de peso das preguiças (PG), *B. variegatus*. A (PG1), B (PG2), C (PG3) e D (PG4). * p<0,05.

A análise estatística mostrou que a variação de peso das PG1, PG2 e PG4, ao longo do período monitorizado, não foi estatisticamente significativa. PG3, no entanto, demonstrou ganho ponderal significativo (p<0,05, teste *t* de *Student*

pareado). Neste animal o ganho de peso corpóreo, durante este período, foi de 40% (Figura 6C).

A Figura 7 mostra o comportamento individual da variação de temperatura retal, ao longo do período de observação dos animais.

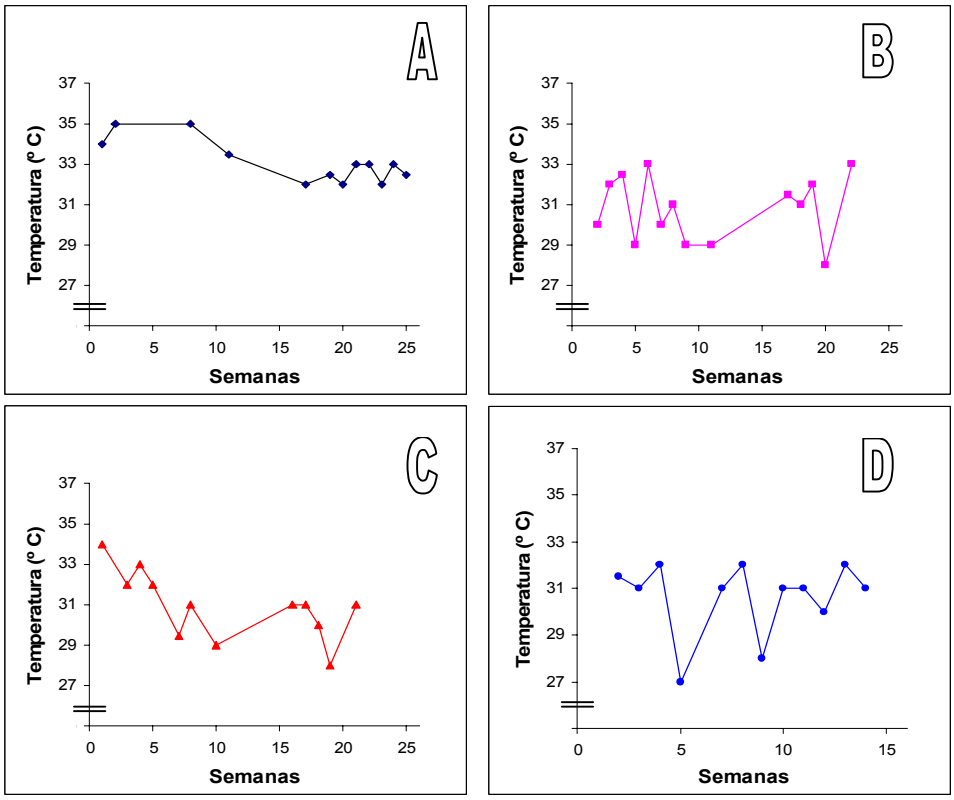

FIGURA 7 – Variação de temperatura retal das preguiças (PG), *B. variegatus*. A (PG1), B (PG2), C (PG3) e D (PG4).

O período de observação compreendeu os meses de março de 2003 a março de 2004 e, neste período, a temperatura ambiente variou de 26ºC a 30ºC (28^{o}C ± 2^{o}C). Observa-se, analisando a Figura 7, que a temperatura retal praticamente não variou ao longo dos dias de monitorização, permanecendo com valor médio de 32ºC ± 1^{o}C.

Ao longo do período de monitorização, verificou-se também, a freqüência de defecação das preguiças e constatou-se que, os quatro animais estudados

defecavam em dias alternados, apresentando uma freqüência média de 2,4 ± 0,4 ocorrências por semana.

4.2. Dosagens hormonais dos metabólitos esteroidais

4.2.1. Diluição

Para obtenção de concentrações, dentro da linearidade adequada à faixa de leitura do equipamento, foi determinada a diluição das amostras fecais em proporções de 1/5 e 1/20 para os metabólitos do E_2 e da P_4, respectivamente.

4.2.2. Parâmetros de controle de qualidade dos ensaios hormonais

O Coeficiente de Variação (CV) intra-ensaio foi inferior a 5% e interensaio, inferior a 1,3%, tanto para os ensaios dos metabólitos fecais do E_2, quanto para os da P_4.

A sensibilidade dos ensaios hormonais foi de 2,42 pg/ mL para os metabólitos do E_2 e de 0,004 ng/ mL para os da P_4.

Os percentuais médios da recuperação fria (R), obtidos para os metabólitos fecais do E_2 e da P_4, foram de 78% e de 73%, respectivamente, traduzindo o quanto de hormônio da amostra se perdeu ao longo do processo de extração.

4.2.3. Validação dos *kits*

As Figuras 8 e 9 mostram, respectivamente, as curvas de paralelismo, com suas respectivas equações, de dosagens dos metabólitos fecais do E_2 e da P_4 a

partir da matriz depletada para a validação dos *kits* da DPC MEDLAB® de fase sólida, utilizados nos extratos fecais em preguiças. O coeficiente de correlação para a curva foi de 0,993 para os metabólitos fecais do E_2 e de 0,977 para os da P_4.

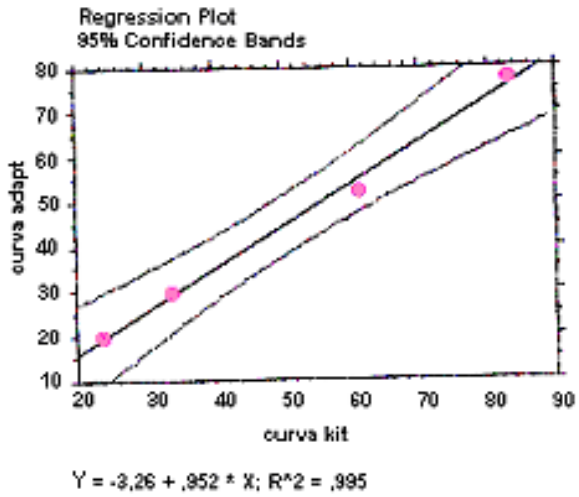

FIGURA 8 – Curva de paralelismo, obtida pelo Contador de Radiação Gama (Canberra Packard) utilizado para dosagem de hormônios, para metabólitos fecais do estradiol utilizando a matriz depletada (r = 0,993).

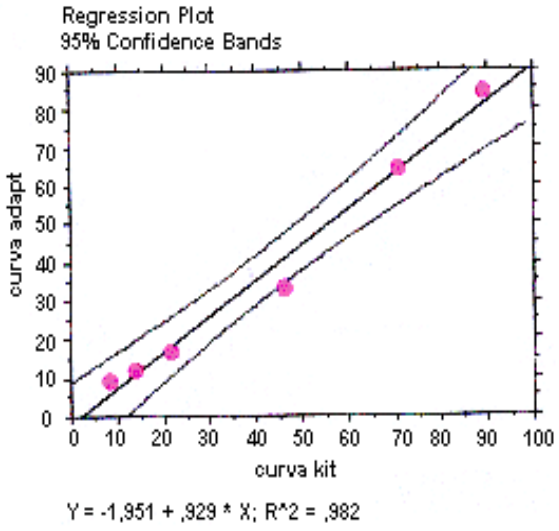

FIGURA 9 - Curva de paralelismo, obtida pelo Contador de Radiação Gama (Canberra Packard) utilizado para dosagem de hormônios, para metabólitos fecais da progesterona utilizando a matriz depletada (r = 0,977).

As Figuras 10 e 11 mostram as curvas de paralelismo, com suas respectivas equações, para dosagem do E_2 (para a validação do *kit* 3º Generation Estradiol RIA) e da P_4 (para a validação do *kit* DPC MEDLAB® de fase sólida) no plasma,

respectivamente. Os coeficientes de correlação foram de 0,997 para a dosagem do E_2 e de 0,994 para a da P_4 plasmática.

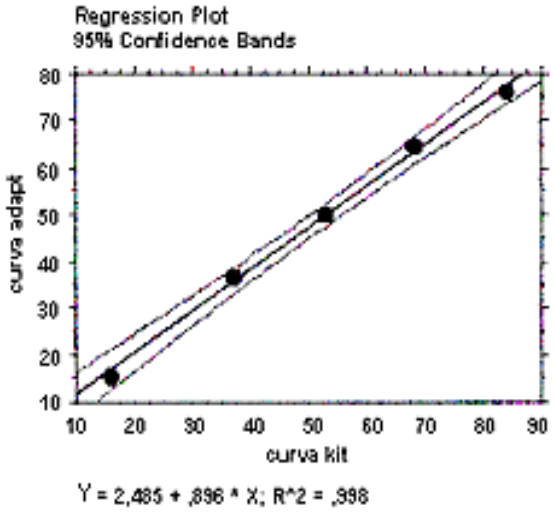

FIGURA 10 - Curva de paralelismo, obtida pelo Contador de Radiação Gama (Canberra Packard) utilizado para dosagem de hormônios, para estradiol plasmático utilizando a matriz depletada (r = 0,997).

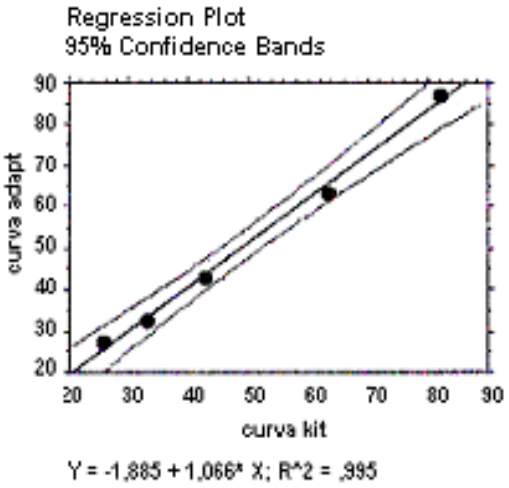

FIGURA 11 - Curva de paralelismo, obtida pelo Contador de Radiação Gama (Canberra Packard) utilizado para dosagem de hormônios, para progesterona plasmática utilizando a matriz depletada (r = 0,994).

4.2.4. Validação da técnica de dosagem dos metabólitos fecais

Foram coletadas dez amostras sangüíneas aleatórias, realizadas sempre no mesmo dia de defecação do animal. A correlação entre o E_2 plasmático e os

metabólitos do E_2 nas fezes encontra-se demonstrada na Figura 12. Verifica-se a existência de relação direta entre os resultados obtidos através da dosagem no plasma com a dosagem via fezes, apresentando uma correlação significativa entre o E_2 plasmático e os metabólitos fecais do mesmo hormônio, ($p<0,05$, teste de *Pearson*). Os níveis hormonais plasmáticos dosados foram inferiores aos dos metabólitos fecais, conforme mostra a Figura 13. Visualiza-se também nesta Figura que, à medida que os níveis de E_2 no sangue aumentam, os dos metabólitos fecais deste hormônio também aumentam.

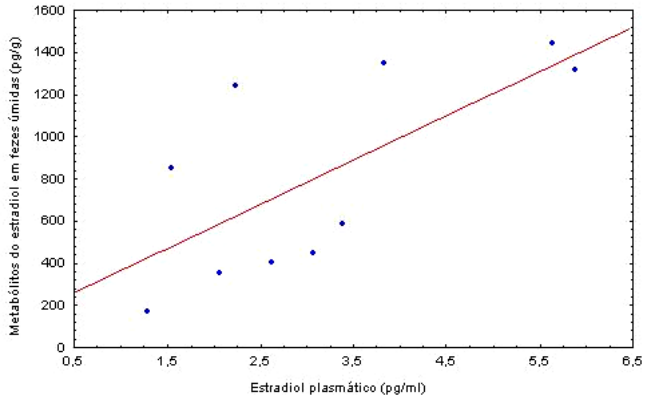

FIGURA 12 – Correlação entre estradiol plasmático e metabólitos do estradiol nas fezes de preguiça (*B. variegatus*), para nível de significância de $p<0,05$ ($r = 0,689$; $F = 7,23$; $df = 1,8$).

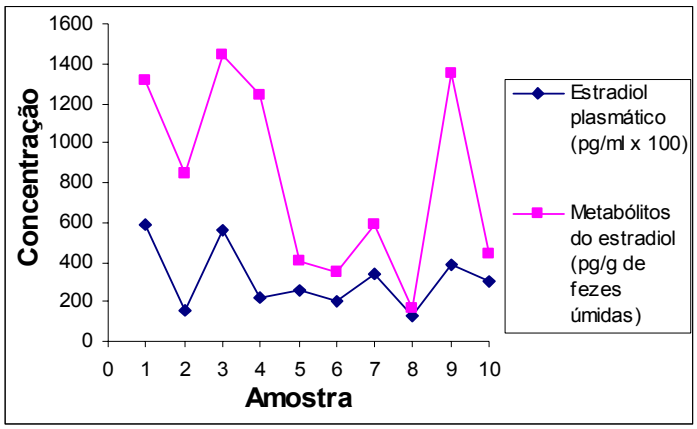

FIGURA 13 - Correlação entre a concentração do estradiol plasmático (pg/mL x 100) e os metabólitos do estradiol nas fezes (pg/g de fezes úmidas) em preguiça (*B. variegatus*).

Em virtude dos níveis plasmáticos da P_4 terem se apresentado muito baixo nas dosagens plasmáticas e de alguns não terem sido detectados nas mesmas, optou-se por deixar de apresentar a correlação plasma/fezes para este hormônio. No entanto, nas amostras dosadas, este hormônio apresentou perfil similar ao do E_2, quando se comparou os níveis hormonais plasmáticos com os fecais.

4.3. Níveis dos Metabólitos Fecais

Foram utilizadas 28 amostras fecais da PG1, 34 da PG2, 60 da PG3 e 31 da PG4, totalizando 153 amostras fecais de *B. variegatus* fêmeas.

4.3.1. Metabólitos do E_2

A Figura 14 mostra a variação individual dos níveis de metabólitos fecais do E_2 nas preguiças, durante os dias de monitorização. Analisando-se esta figura, verifica-se que, embora existam flutuações desses níveis em todas preguiças estudadas, nas PG3 (Figura 14C) e PG4 (Figura 14D) estas flutuações apresentaram-se similares. Observa-se que em PG3 e PG4, ocorreram elevações nos níveis dos metabólitos do E_2, os quais mantiveram-se elevados formando um "platô". Após esse período, queda brusca ocorreu nesses níveis. A PG4 mostrou níveis hormonais mais elevados em relação às demais preguiças. Este resultado pode ser evidenciado na Figura 15, cujos níveis hormonais dosados, nos quatro animais, foram sobrepostos.

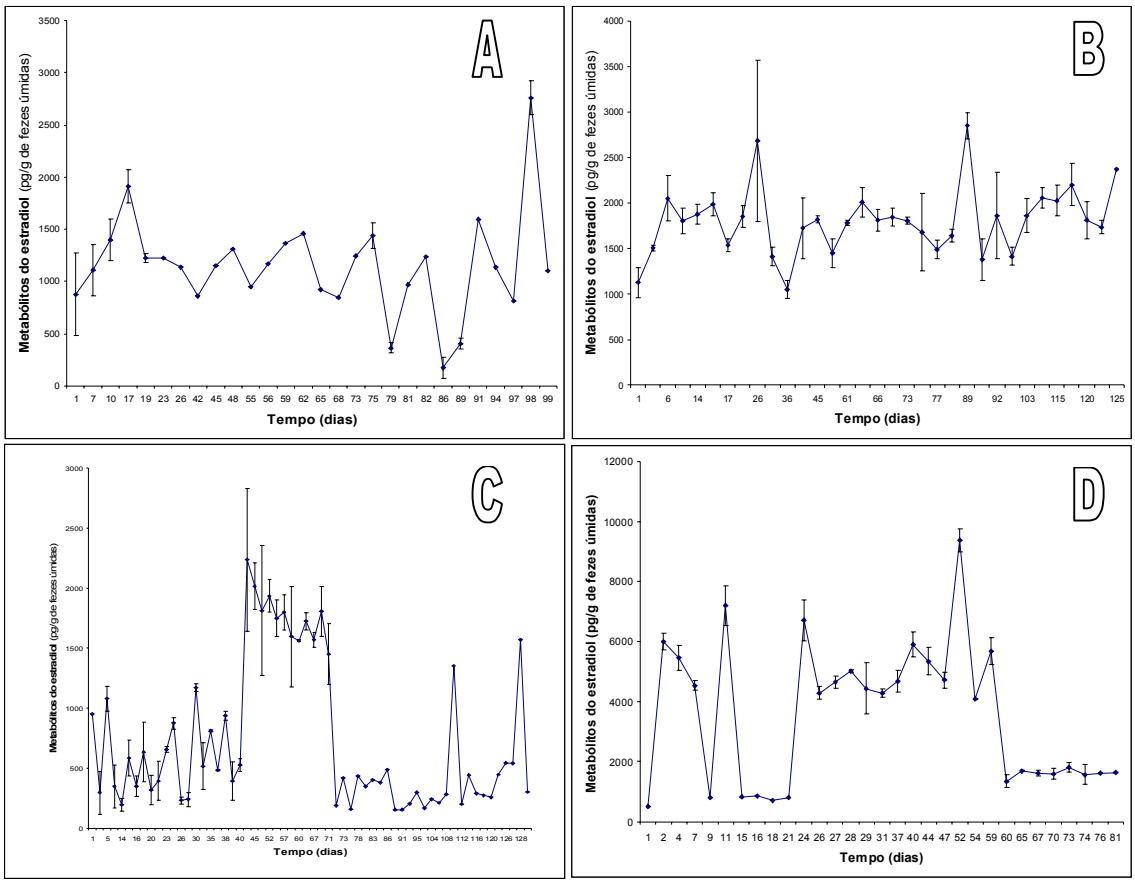

FIGURA 14 – Níveis hormonais individuais dos metabólitos fecais do estradiol em preguiças (PG), *Bradypus variegatus.* A (PG1), B (PG2), C (PG3) e D (PG4).

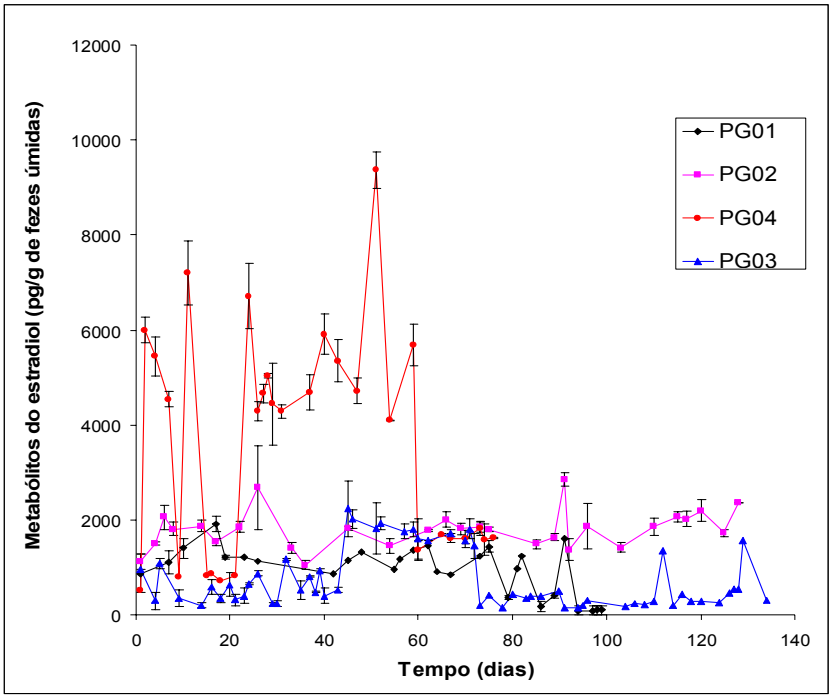

FIGURA 15 – Sobreposição dos níveis hormonais individuais dos metabólitos fecais do estradiol em preguiças (*B. variegatus*), durante período de monitorização. PG – preguiça.

4.3.2. Metabólitos da P_4

A Figura 16 mostra a variação individual dos níveis dos metabólitos da P_4, durante os dias de monitorização, nas preguiças estudadas. Analisando-se esta figura, verifica-se que, de maneira semelhante ao encontrado para os metabólitos do E_2, as PG3 e PG4 (Figura 16C e D, respectivamente) apresentaram elevação nos níveis dos metabólitos da P_4, imediatamente após queda dos níveis dos metabólitos do E_2. Em PG3, os níveis dos metabólitos da P_4 caíram, após ter sido alcançado pico máximo, enquanto que, em PG4, estes níveis mantiveram-se elevados durante todo o restante do período de monitorização.

Similarmente ao observado para os níveis dos metabólitos do E_2, os níveis dos metabólitos de P_4 foram mais elevados em PG4 em relação às demais, conforme evidencia a Figura 17, na qual as flutuações hormonais foram sobrepostas.

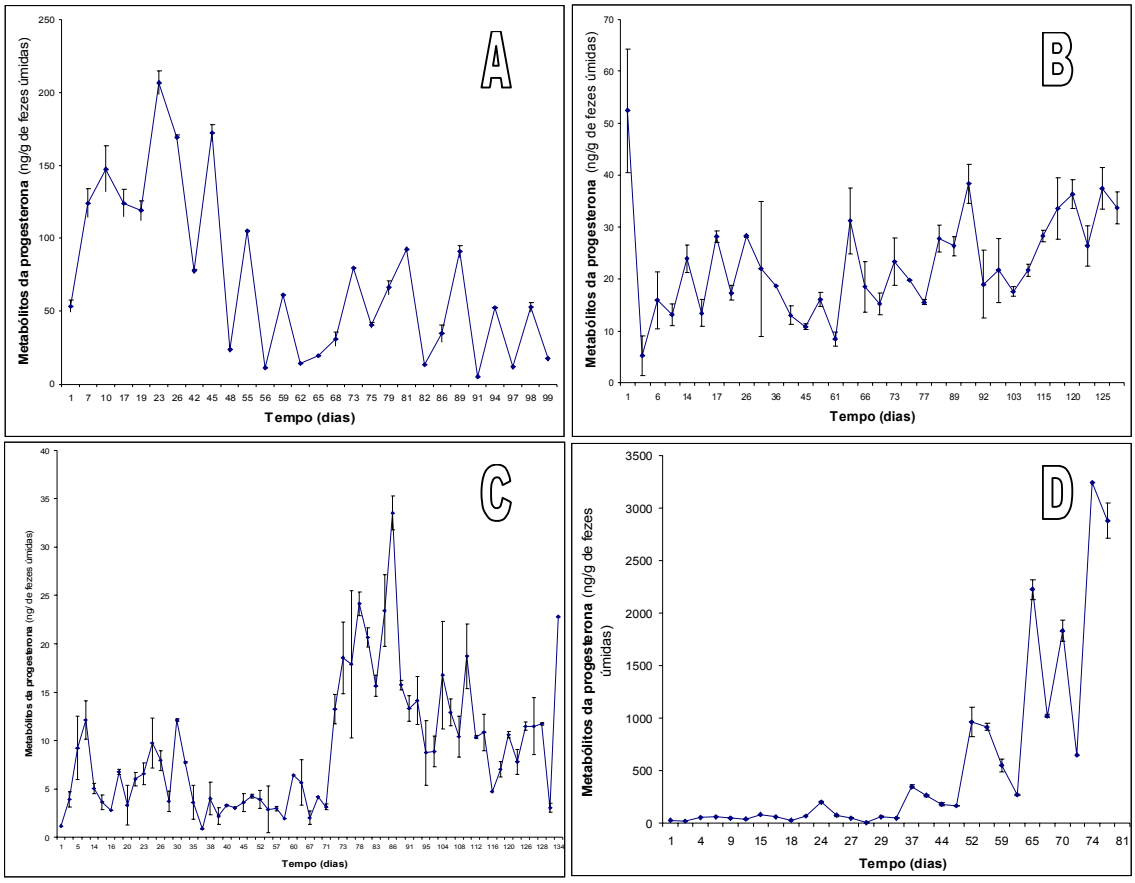

FIGURA 16 – Níveis hormonais individuais dos metabólitos fecais da progesterona em preguiças (PG), *Bradypus variegatus.* A (PG1), B (PG2), C (PG3) e D (PG4).

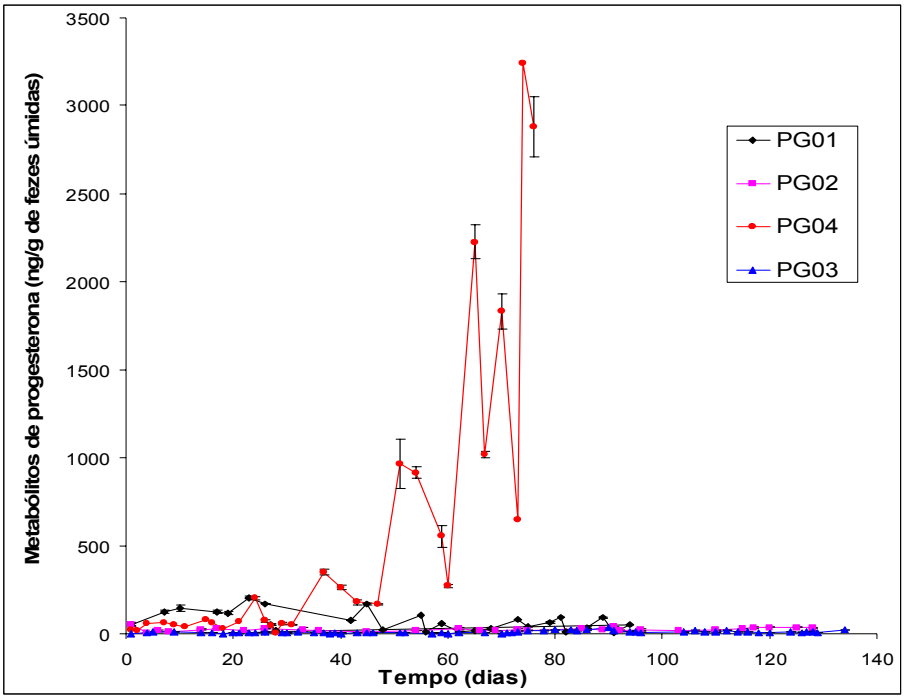

FIGURA 17 – Sobreposição dos níveis hormonais individuais dos metabólitos fecais da progesterona em preguiças (*B. variegatus*), durante período de monitorização. PG – preguiça.

4.3.3. Flutuações dos metabólitos do E_2 e da P_4 nas PG3 e PG4

As Figuras 18 e 19 mostram, respectivamente, as flutuações dos metabólitos de E_2 e de P_4 para PG3 e PG4, durante o período de monitorização.

Na Figura 18, observa-se aumento nos níveis dos metabólitos do E_2 ocorrido em torno do quadragésimo dia de monitorização. Estes níveis mantiveram-se elevados, formando um "platô", por cerca de trinta dias, apresentando queda brusca no septuagésimo dia, a partir do qual, verifica-se elevação dos níveis dos metabólitos da P_4. Queda dos níveis dos metabólitos do E_2, concomitante ao aumento dos níveis dos metabólitos da P_4 encontra-se assinalado por uma seta, na Figura 18. Os elevados níveis dos metabólitos da P_4, pico máximo alcançado por volta do octogésimo sexto dia, caíram bruscamente, mantendo-se mais baixos durante o restante do período de monitorização.

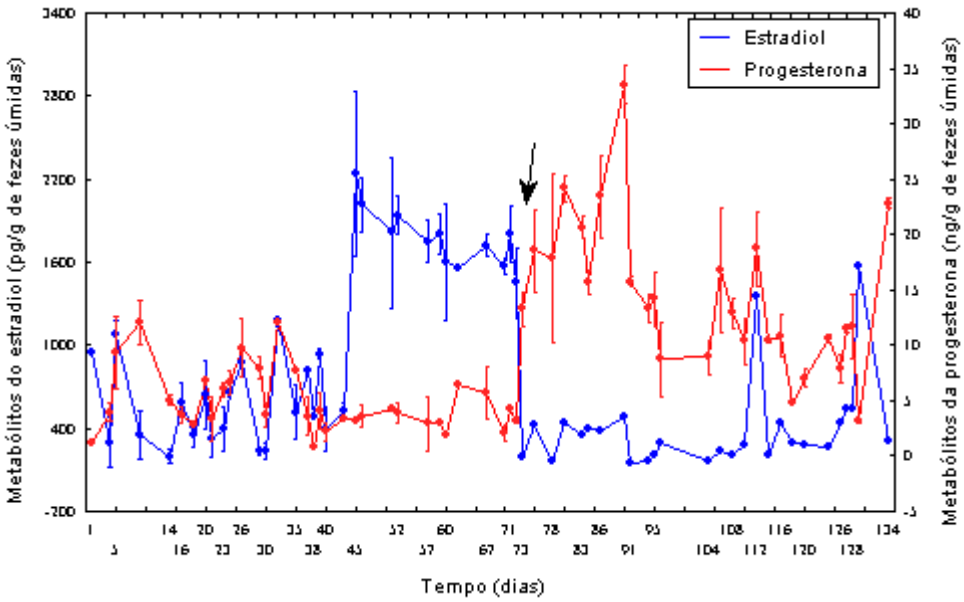

FIGURA 18 – Flutuações dos metabólitos fecais do estradiol e da progesterona na preguiça (*Bradypus variegatus*). Dados obtidos da preguiça 3.

A Figura 19 mostra as flutuações hormonais encontradas na PG4. Observa-se que os níveis dos metabólitos do E_2 elevaram-se a partir do vigésimo segundo dia de monitorização, permanecendo elevados, formando um “platô”, por cerca de trinta e sete dias. Após esse período, queda brusca dos mesmos ocorreu por volta do qüinquagésimo nono dia, seguido, a partir do sexagésimo dia, de elevação nos níveis dos metabólitos da P_4, demonstrado nesta figura por uma seta.

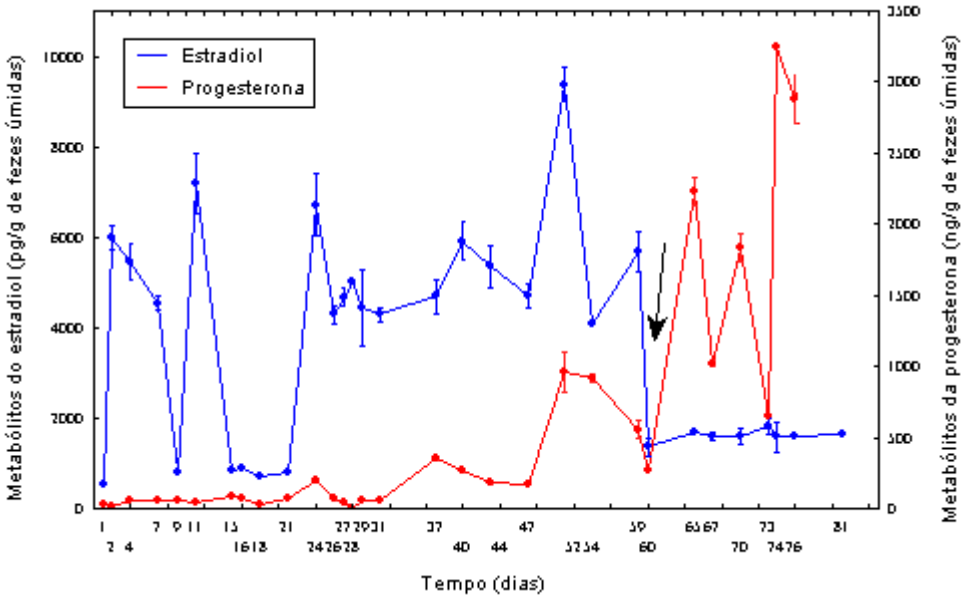

FIGURA 19 – Flutuações dos metabólitos fecais do estradiol e da progesterona na preguiça (*Bradypus variegatus*). Dados obtidos da preguiça 4.

Embora tenham apresentado flutuações hormonais similares, os níveis dos metabólitos do E_2 e da P_4 na PG4 (Figura 19) foram consideravelmente mais elevados em relação à PG3 (Figura 18).

Diferentemente da PG3, os níveis dos metabólitos da P_4 na PG4 mantiveram-se elevados até o final do período de monitorização.

4.4. Liberação das preguiças

Após a finalização do presente estudo, os animais permaneceram nos preguiçários aguardando autorização do IBAMA para serem liberados e reintegrados nas matas existentes nas vizinhanças da cidade do Recife. Durante este período, observou-se que a PG4 apresentava abdômen globoso e aparente ganho de peso corporal. Diante desta constatação, foi solicitado ao IBAMA, a permanência desta fêmea na Granja Ananda, em Aldeia – Camaragibe – PE, por um período complementar para que a mesma fosse monitorizada. No dia 30 de julho de 2004, a mesma pariu um filhote sadio, apresentado na Figura 20.

FIGURA 20 – Filhote da preguiça 4 com dois dias de vida (Fotografia: Da Costa, C. P., 2004).

5. DISCUSSÃO

Estudar animais selvagens em condições de cativeiro, visando conhecer sua fisiologia exige, do pesquisador, habilidade no seu manejo e conhecimento de como esses animais comportam-se no seu habitat. Assim, o cativeiro deverá não só reproduzir condições similares ao contexto ambiental, quando os mesmos encontram-se em liberdade, como também possibilitar ao animal o mínimo de distúrbio. Isto pode ser obtido quando o contato animal-pesquisador ocorre com uma reduzida freqüência, evitando estresse, que poderia não só falsear os resultados, como também modificar os parâmetros fisiológicos coletados (COUBROUGH, 1985).

Quando se trata de estudos que envolvem a fisiologia endócrina, os quais poderão contribuir para a preservação de uma dada espécie, esses aspectos passam a ter uma maior relevância. Dobson e Smith (2000) constataram que as condições do cativeiro não apenas influenciam o comportamento dos animais, mas também estão associadas a marcantes alterações fisiológicas, que podem afetar a fertilidade de forma positiva ou negativa, dependendo do tipo de interação. Ainda segundo esses autores, o estresse é determinado pela inabilidade do animal em adaptar-se ao seu ambiente, existindo evidências endócrinas, as quais demonstraram que agentes estressantes interferem com os tempos precisos das liberações de hormônios reprodutivos durante a fase folicular (COUBROUGH, 1985).

Ainda segundo Dobson e Smith (2000), o manuseio de animais, como contenção, transporte ou coleta de sangue, funciona como agente estressante; quando o estresse ocorre por breve período, isto é, por segundos altera a liberação de catecolaminas; se o estresse durar minutos, altera a secreção de glicocorticóides,

hormônios gonadais e tireoidianos e, se ocorrer por algumas horas pode alterar parâmetros imunológicos.

Para atender as peculiaridades comportamentais das preguiças, os preguiçários (Figura 4A e B) possuíam troncos de árvores, que permitiam ao animal manter-se nas posturas adotadas com total liberdade de movimento e condições adequadas de alimentação, ventilação e iluminação. Além disso, as dimensões do espaço dos preguiçários enquadraram-se nos requisitos propostos pela Instituição Normativa 001/89-P do IBAMA, de 19 de outubro de 1989.

Estudos realizados por Duarte et al. (1982) em preguiças, demonstraram que, antes do início dos procedimentos experimentais, esses animais devem ser mantidos sob observação no preguiçário, pelo menos por uma semana. Desse modo, e, em conformidade ao comportamento exibido pelos animais, na primeira semana, estes foram mantidos no preguiçário, durante este período, o que garantiu a adaptação dos mesmos ao cativeiro.

Durante o período em que foram estudadas e que permaneceram no preguiçário, constatou-se que as preguiças encontravam-se saudáveis e adaptadas à vida cativa, já que o peso corporal das mesmas, ao longo das semanas de monitorização (Figura 6), praticamente não se alterou, isto é, as fêmeas não perderam peso, inclusive uma delas (PG3) chegou a aumentar significativamente seu peso em 40%, em relação ao peso inicial ($p<0.05$, teste *t* de *Student* pareado).

Com relação à temperatura corporal, as preguiças do gênero *Bradypus* apresentam variação na faixa compreendida entre 28ºC e 32ºC (OZÓRIO DE ALMEIDA e BRANCA DE FIALHO, 1924; KREDEL, 1928 apud GOFFART, 1971)[11]. Os valores de temperatura encontrados em nossos animais (32 ± 1ºC) situaram-se, portanto, próximos desta faixa.

[11] KREDEL, F. E. Note on the temperature of the sloth. **Journal of. Mammalogy**, v. 9. p. 48-51, 1928.

Neste estudo, foi avaliado, por cerca de doze semanas, a função ovariana em preguiças, mamíferos selvagens encontrados com freqüência nas matas da região Nordeste, uma vez que, até o presente, nenhum estudo não invasivo havia sido realizado com estes animais, nesta área de conhecimento.

Quando se pretende estudar ou utilizar técnicas reprodutivas, tais como inseminação artificial, fertilização *in vitro* ou transferência de embrião, com a finalidade de perpetuar a espécie (DOBSON e SMITH, 2000), é imprescindível a determinação do estado reprodutivo do animal. O exato tempo para a inseminação artificial, por exemplo, é algo limitante que, torna-se muito mais fácil se o ciclo estral do animal for determinado e conhecido.

A dosagem de hormônios gonadais pelas amostras sangüíneas possibilita tal conhecimento com exatidão. No entanto, nos animais selvagens, as coletas sangüíneas tornam-se difíceis, necessitando da contenção ou até da introdução de cânulas crônicas nos seus vasos sangüíneos, procedimentos que exigem cirurgia, assepsia e cobertura com antibiótico, os quais podem gerar estresse. Desse modo, coletas de amostras de urina ou de fezes para dosagens hormonais dos metabólitos esteroidais podem ser obtidas com o propósito de minimizar e, até mesmo eliminar o estresse da coleta. Entretanto, a coleta de urina limita seu uso na investigação hormonal de animais em liberdade por necessitar da contenção e manipulação dos mesmos pelo pesquisador, visando colocação de sonda uretral para obtenção dessa amostra. Assim, amostras fecais representam a escolha mais prática e menos estressante para este propósito.

O desenvolvimento de técnicas, tais com RIE, para extração e análise de esteróides reprodutivos de material fecal tornou possível a obtenção de dados endocrinológicos de reprodução (ZIEGLER et al., 1997). Embora haja limitações

para o uso das fezes na análise hormonal, a técnica possibilita monitorizar os níveis de esteróides na determinação aproximada do período de ovulação e concepção. Ressalta-se, ainda, que a monitoração fetal durante a gravidez pode ser realizada por intermédio dos extratos fecais maternos (ZIEGLER et al., 1997).

A extração e a posterior dosagem por RIE de esteróides fecais representam uma técnica não-invasiva nova e valiosa que vem sendo, a cada dia, mais utilizada, tanto em estudos de animais mantidos em cativeiro quanto em liberdade, para avaliar a reprodução, o estresse ambiental e o comportamento agressivo destes. A extração de esteróides pelas fezes tem permitido prover medidas diárias de hormônios reprodutivos durante o ciclo ovariano e/ou gravidez (WASSER, 1994 apud ZIEGLER et al., 1997; SCHWARZENBERGER et al., 1997; WHITTEN *et al.*, 1998)[12]. Sua aplicação vem se expandindo para dosagem da concentração de esteróides, visando investigar: ocorrência de reprodução sazonal (BROCKMAN et al., 2001 apud LYNCH et al., 2003; CAVIGELLI, 1999; LYNCH et al., 2002; STRIER et al., 1999 apud LYNCH et al., 2003; ZIEGLER et al., 2000)[13,14], existência de estresse (BOINSKI et al., 1999; CREEL et al., 1996 apud LYNCH et al., 2003; DEHNHARD et al., 2001; GOYMANN et al., 1999)[15], aspectos da ontogenia

---

[12] WASSER, S. K. Reproductive function in wild baboons measured by fecal steroids: Implications for biomedicine and conservation. **American Journal of Primatology**, v. 33, p. 247-248, 1994.

[13] BROCKMAN, D. K.; WHITTEN, P. L.; RICHARD, A. F.; BENANDER, B. Birth season testosterone levels in male Verreaux's sifaka, *Propithecus verreauxi*: insights into socio-demographic factors mediating seasonal testicular function. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 49, p. 117-127, 2001.

[14] STRIER, K. B.; ZIEGLER, T. E.; WITTWER, D. Seasonal and social correlates of fecal testosterone and cortisol levels in wild male muriquis (*Brachyteles arachnoides*). **Hormones and Behavior**, v. 35, p. 125-134, 1999.

[15] CREEL, S.; CREEL, N. M.; MONFORT, S. L. Social stress and dominance. **Nature**, v. 379, p. 212, 1996.

(STRIER e ZIEGLER, 2000 apud LYNCH et al., 2003)[16], classificação taxonômica (KRAUS et al., 1999 apud LYNCH et al., 2003)[17], o acasalamento e a presença de agressão em machos (BROCKMAN et al., 1998 apud LYNCH et al., 2003; LYNCH et al., 2002; OSTNER et al., 2002 apud LYNCH et al., 2003)[18,19]. Neste contexto, glicocorticóides e andrógenos uniram-se como marcos de interesse nas análises de esteróides fecais (KHAN et al., 2002; LYNCH et al., 2003). As fezes podem ser coletadas sem o contato direto com o animal, sem o uso de armadilhas ou ainda, sem provocar alterações na atividade do grupo social, desde que o grupo esteja habituado ao coletor.

O presente estudo propôs-se, inicialmente, em confirmar a viabilidade da utilização do método não-invasivo para dosagens dos hormônios esteróides em fezes de preguiças, por meio da técnica de RIE. Esta técnica é utilizada para medir a concentração de um metabólito particular ou proteína (ex: esteróides, receptores, etc.) em uma determinada amostra (urina, extrato fecal, soro, plasma, etc.). O RIE utiliza a especificidade dos anticorpos em se ligarem aos antígenos (CHARD, 1989), que, nesse caso, os de interesse são os metabólitos de esteróides.

A importância da técnica de RIE reside na sua especificidade, em seu alto grau de sensibilidade e na possibilidade que oferece de medida simultânea de muitas amostras de hormônios ou metabólitos hormonais (MARSHALL, 1995).

[16] STRIER, K. B.; ZIEGLER, T. E. Lack of pubertal influences on female dispersal in muriqui monkeys, *Brachyteles arachnoides*. **Animal Behaviour.** V. 59. 2000. p. 849-860.

[17] KRAUS, C.; HEISTERMANN, M.; KAPPELER, P. M. Physiological suppression of sexual function of subordinate males: a subtle form of intrasexual competition among male sifakas (*Propithecus verreauxi*). **Physiology and Behavior**, v. 66, p. 855-861, 1999.

[18] BROCKMAN, D. K.; WHITTEN, P. L.; RICHARD, A. F.; SCHNEIDER, A. Reproduction in free-ranging male *Propithecus verreauxi*: the hormonal correlates of mating and aggression. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 105, p. 137-151, 1998.

[19] OSTNER, J.; KAPPELER, P. M.; HEISTERMANN, M. Seasonal variation and social correlates of androgen excretion in male redfronted lemurs (*Eulemur fulvus rufus*). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 52, p. 485-495, 2002.

A sensibilidade representa a menor concentração detectada, que é estatisticamente diferente de zero. Neste trabalho, essa concentração mínima detectável (CMD) pelo *kit* foi baixa para ambos hormônios dosados, tratando-se de *kits* sensíveis. Verifica-se também, que os *kits* utilizados foram específicos com pouca reação cruzada e que os ensaios de controle de qualidade, os coeficientes de variação (CV) intra e interensaios apresentaram valores baixos, sendo inferiores a 5% e 1,3%, respectivamente. Estes resultados mostraram, portanto, que os *kits* foram precisos, uma vez que, segundo Moreira et al. (2001), o CV intra-ensaio e interensaio devem ser menores que 10% e 15%, respectivamente, para que os mesmos sejam considerados precisos.

Os *kits*, utilizados para dosar os metabólitos fecais e plasmáticos do E_2 e da P_4 em preguiças, foram validados através da demonstração do paralelismo de matriz depletada dos resultados encontrados nas fezes (Figuras 8 e 9) e no plasma (Figuras 10 e 11). Por esses resultados foi obtida a confirmação de esses *kits* podem ser utilizados em fezes de preguiças.

Como este trabalho foi pioneiro em utilizar extratos fecais de preguiças para dosar hormônios esteróides gonadais, fez-se necessária também coleta de amostras sangüíneas para validação da técnica de dosagem dos metabólitos fecais destes. Os resultados apresentaram uma correlação significativa entre os níveis do E_2 plasmático e os dos metabólitos fecais do mesmo hormônio ($p<0,05$; $r = 0,689$; $F = 7,23$; $df = 1,8$, teste de *Pearson*), validando, portanto, o uso de extratos fecais de preguiças para dosagens destes metabólitos. As amostras sangüíneas coletadas representaram 7% do total de amostras fecais, evidenciando que este trabalho foi fundamentalmente não-invasivo. As concentrações de esteróides nas fezes exibiram um perfil similar ao encontrado no plasma, existindo uma série de estudos na

literatura que demonstram haver uma correspondência bem próxima entre as medidas hormonais encontradas nestas amostras (WASSER *et. al*., 1991; WASSER, 1996; BROWN *et. al*., 1996; ZIEGLER *et. al*., 1996). Neste estudo foi comprovada existência de uma relação direta e paralela entre os níveis plasmáticos de E_2 com os metabólitos deste dosado nas fezes, conforme mostra a Figura 12.

Embora tenha sido comprovada esta relação direta e paralela entre os níveis plasmáticos de E_2 com os metabólitos fecais, observa-se que os níveis deste foram significativamente mais elevados nas fezes quando comparados aos do plasma (Figura 13). Isto decorre do fato de que as concentrações de hormônios nas fezes refletem um acúmulo de metabólitos hormonais secretados e mantidos no bolo fecal no organismo. Os esteróides por serem liberados diretamente na circulação, entram em contato direto com os tecidos do corpo sendo metabolizados no fígado, de onde são excretados na bile, seguindo, posteriormente, para os intestinos (ZIEGLER et al., 1996). Os níveis plasmáticos, por sua vez, são momentâneos, refletindo apenas a concentração do hormônio circulante no exato momento da coleta.

Vários estudos comparando as concentrações de esteróides nas fezes e no plasma, durante o ciclo estral em mamíferos, indicaram ocorrer uma defasagem nas concentrações fecais quando comparadas às plasmáticas (SCHWARZENBERGER et al., 1992 e 1996; SHIDELER et al., 1993; WASSER, 1994 apud ZIEGLER et al., 1997; ZIEGLER et al., 1996; BERKELEY, 1994)[20]. Dependendo da espécie, a defasagem pode ser de 12 a 72 horas (SCHWARZENBERGER et al., 1996); sendo cerca de 48 horas em éguas (SCHWARZENBERGER et al., 1992), em algumas espécies de primatas (SHIDELER et al., 1993; WASSER, 1994 apud ZIEGLER et al., 1997; ZIEGLER et al., 1996)[21] e em rinocerontes (BERKELEY, 1994).

---

[20] WASSER, S. K. Reproductive function in wild baboons measured by fecal steroids: Implications for biomedicine and conservation. **American Journal of Primatology**, v. 33, p. 247-248, 1994.

[21] Ibidem, p. 247-248.

Neste trabalho, como as coletas de amostras sanguíneas foram realizadas sempre no dia da defecação, informações quanto ao grau de defasagem existente entre os níveis hormonais fecais e plasmáticos dos esteróides gonadais deixaram de ser obtidas. Embora este trabalho tenha trazido uma contribuição substancial para o conhecimento da função ovariana de preguiças, investigações complementares deverão ser realizadas em outro momento, através de coletas plasmáticas seriadas, de modo a se ter idéia da existência do grau de defasagem entre os níveis hormonais plasmáticos e seus metabólitos fecais.

O único estudo até então realizado para investigar aspectos reprodutivos destes animais foi o desenvolvido por Gilmore et al. (1991), no qual avaliaram os efeitos provocados pelo hormônio liberador do Hormônio Luteinizante (LHRH) nos esteróides sexuais e sobre os níveis plasmáticos das gonadotrofinas em machos e em uma fêmea prenha. Neste estudo, os autores realizaram contenção do animal e coletas de sangue invasivamente, através da canulação de vasos sangüíneos, o que pode ter gerado estresse. Neste estudo foi observado que os machos responderam rapidamente ao LHRH exógeno aumentando a secreção de LH. No entanto, na fêmea prenha, não houve resposta a este hormônio exógeno em função dos níveis de LH encontrarem-se previamente elevados.

Além de testar e validar uma técnica não invasiva em preguiças, para dosagens de metabólitos hormonais fecais, este trabalho possibilitou obter também informações do intervalo e número de defecações apresentadas por estes animais neste período. Dados da literatura relatam que as preguiças apresentam uma característica pouco comum em relação a outros mamíferos. O bolo alimentar demora cerca de oito dias para percorrer todo o trato digestivo (DE LA FUENTE, 1979 apud DINIZ et al, 1999)[22] acarretando um intervalo, entre defecações, de cerca

[22] DE LA FUENTE, F. R. A Fauna – Vida e Costumes dos Animais Selvagens. v. 8. Salvat Editora do Brasil Ltda, Rio de Janeiro, 1979.

de oito dias (MONTGOMERY e SUNQUIST, 1978; SCHLOBIES et al., 2001). Conforme apresentado na Tabela 1, a freqüência média de defecação encontrada em preguiças nesse estudo, foi de cerca de duas defecações por semana. Verificou-se também, analisando individualmente a freqüência de defecação dos quatro animais estudados, que os mesmos defecavam praticamente em dias alternados, diferindo, portanto, dos dados obtidos por Montgomery e Sunquist (1978).

Os resultados obtidos neste estudo permitiram informações da função ovariana nestes animais, obtendo, pela primeira vez, informações a respeito do ciclo estral em *B. variegatus*.

Em mamíferos, um ciclo estral típico é caracterizado por duas fases fundamentais: a fase proliferativa ou folicular, com ação predominantemente de estrógenos (estradiol, estrona e estriol), e a fase progestacional, a qual ocorre após a ovulação, estando relacionada à ação dos hormônios produzidos pelo corpo lúteo, o estrógeno e, principalmente, a progesterona (MARSHALL, 1995).

Na primeira fase, há desenvolvimento gradual dos folículos ovarianos e secreção de estrógenos, sob o comando do Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e de sua associação com o Hormônio Luteinizante (LH). Em humanos, os primeiros dias de um ciclo menstrual, de vinte e oito dias, caracterizam-se por baixos e relativamente constantes níveis de estrógenos e de progesterona. Dos sete aos quatorze dias, os níveis estrogênicos, principalmente do estradiol, elevam-se gradativamente no início, subindo depois rapidamente até atingir o pico máximo, cerca de 24 h antes do pico pré-ovulatório do LH. Durante este período, os níveis de estrógenos urinários seguem as mesmas flutuações plasmáticas deste hormônio. No fim da fase proliferativa, ocorre a ovulação, que consiste no rompimento do folículo maduro e liberação do óvulo, que será captado pelas fímbrias e impulsionado em

direção ao útero. Durante este percurso, o óvulo pode ser ou não fecundado; o restante do folículo forma o corpo lúteo, que pode ser funcionante ou não, segundo a espécie considerada (MARSHALL, 1995). Com a formação do corpo lúteo, os níveis de progesterona aumentam gradualmente (MARSHALL, 1995).

Em ratos, no entanto, não há uma fase progestacional típica, a menos que haja fecundação ou coito; o ciclo estral tem a duração de quatro a cinco dias, envolvendo as seguintes fases: metaestro, durando de um a dois dias; diestro, um dia; proestro,12h, e estro, um dia (MARSHALL, 1995).

Em função de, no presente trabalho, terem sido estudadas apenas quatro fêmeas, com perfis hormonais próprios, não foi possível determinar a duração média do ciclo ovariano no período estudado. Este resultado deve-se ao fato de que não é possível selecionar um grupo homogêneo de animais, uma vez que a obtenção dos mesmos fica condicionada à disponibilidade do IBAMA em cedê-los ao Laboratório do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco.

Em duas fêmeas (PG3 e PG4) observou-se um perfil de flutuação nos níveis dos metabólitos do E_2 e da P_4 similares. Foi encontrado aumento brusco nos níveis do metabólitos do E_2, tanto em PG3 (Figura 14C e 18) quanto em PG4 (Figuras 14D e 19), com manutenção desses níveis em “platô” por cerca de trinta dias, em PG3 (Figura 18), e por trinta e sete dias em PG4 (Figura 19), seguido de queda brusca nesses níveis que coincidiram com aumentos nos níveis dos metabólitos da P_4, para cada preguiça citada. Estes resultados sugerem ocorrência de ovulação e formação do corpo lúteo. Observou-se, no entanto, que na PG3 (Figuras 16C e 18), os níveis dos metabólitos da P_4 caíram, após o pico máximo ser alcançado, enquanto que, na PG4, os níveis permaneceram elevados até o final do período de monitorização

(Figuras 16D e 19). Este resultado é bastante interessante já que é similar qualitativamente em ambas. No entanto, dois aspectos relevantes puderam ser identificados na PG4 em relação a PG3: 1) os níveis hormonais apresentaram-se extremamente elevados, e 2) os níveis dos metabólitos da P_4 permaneceram elevados. Assim, os perfis hormonais dessas duas preguiças, quando comparados com os das outras, parecem comprovar que houve ovulação nessas com formação do corpo lúteo. Os resultados apresentados na PG3 sugerem que o intervalo entre uma ovulação e outra, ou seja, a duração do ciclo estral poderia ser superior a 60 dias (Figura 18).

Os níveis hormonais mais elevados na PG4 em relação às demais, associado à constatação, posterior ao término do estudo, do parto deste animal, sugerem que os hormônios esteroidais foram produzidos pela placenta.

A placenta humana produz, principalmente, o estriol e a progesterona, sendo o estriol um dos metabólitos do E_2 (MARSHALL, 1995). Sabe-se também que a placenta fornece a maior parte dos estrógenos excretados na gestação; ocorrendo aumento na produção destes hormônios durante a gravidez (MARTINS, 1986). Cabe ressaltar que o feto humano também secreta gonadotrofinas (ZUGAIB e KANAS, 1986). Tal fato pode ser causado por uma secreção autônoma hipofisária ou por uma resposta à secreção irrestrita do fator liberador hipotalâmico, o qual teria influência sobre a secreção hipofisária de gonadotrofinas, mesmo antes da total maturação do sistema porta (ZUGAIB e KANAS, 1986).

Em preguiças, Wislocki (1928) e Heuser e Wislocki (1935) afirmaram que o desenvolvimento intrauterino, particularmente, o líquido amniótico e o saco vitelino da placenta possuem uma relação estreita em similaridade com os vários estágios de desenvolvimento humano. Em 1982, King et al., visualizaram, em preguiças

tridáctilas, que muitas células do estroma fetal da placenta desses animais apresentavam caráter epitelióide. Segundo esses autores, estas células epitelióides também estão presentes em tatus e tamanduás, o que caracteriza a placenta da ordem *Edentata*. Essas células possuem características ultraestruturais de células secretoras de proteínas e parecem ser sinteticamente ativas, conforme relatado por King et al. (1982). Esses autores ainda sugerem que elas teriam ação endócrina, sendo responsáveis pela produção placentária de hormônios gonadotróficos, além de produzirem materiais da matriz extracelular da placenta. Amorim (2000), nos seus estudos em preguiças, também confirmou a presença dessas células epitelióides nas placentas de preguiças *Bradypus variegatus.*

Segundo Goffart (1971), o período de gestação em preguiças *B. variegatus* tem sido, há tempos, estimada como sendo entre seis e oito meses, com um ano de intervalo entre os nascimentos, por outro lado, Taube et al. (2001) afirma ser de cerca de seis meses.

Os altos níveis dos metabólitos de E_2, desde o início das dosagens e a manutenção dos níveis dos metabólitos da P_4, encontrados em PG4, sugerem que esta fêmea, fornecida pelo IBAMA em meados de dezembro de 2003 e, monitorizada de janeiro a março de 2004, já se encontrava prenha, uma vez que a mesma permaneceu no preguiçário isolada e sem contato com outros machos. Sendo assim, o período de gestação em *B. variegatus* seria superior a sete meses, já que esta pariu um filhote final de julho. Contudo, não se pode afirmar com exatidão a duração de uma gestação nesta espécie, devido à falta de dados na literatura que informem precisamente quando a placenta é formada.

Os demais animais apresentaram resultados sem picos significativos dos metabólitos de E_2 e da P_4, e com níveis aquém da fêmea prenha (PG4), conforme

mostra as Figuras 15 e 17. Tal fato pode ter ocorrido pelas seguintes razões: a) por as mesmas não se encontrarem prenhas; b) pelo fato da PG2 ter sido encontrada com um filhote recém-nascido, o que sugere uma gestação recente e, conseqüentemente, justifica a inexistência de ovulação no período considerado, provavelmente, no puerpério. Neste, altos níveis de prolactina são encontrados e, este hormônio, em função da súbita perda de secreção de estrogênio e progesterona pela placenta no momento do parto, assume seu papel natural de estimular a secreção de leite materno; por sua vez, o aumento nos níveis de prolactina inibe a secreção do hormônio de liberação das gonadotrofinas pelo hipotálamo, suprimindo a formação dos hormônios gonadotróficos hipofisários (o Hormônio Luteinizante – LH – e o Hormônio Folículo Estimulante – FSH) (MARSHALL, 1995); a PG3 apresentava peso inferior às demais e parece ter ovulado, mas, como não estava prenha, os níveis hormonais do E_2 e da P_4 encontravam-se baixos conforme os valores de PG1 e PG2; a PG1, apesar de apresentar peso médio (3,3 kg) similar à da PG2, pode ter sofrido estresse e, conseqüentemente, alterações na liberação hormonal, uma vez que foi a única preguiça que permaneceu no preguiçário do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, no Campus da Universidade Federal de Pernambuco, que, embora com isolamento, é um local aberto com tráfego constante de estudantes, o qual expunha o animal à curiosidade pública.

Cabe aqui uma reflexão mais aprofundada sobre o grau de maturidade em preguiças, afinal há divergências na literatura quanto ao peso de animais adultos caracterizar maturidade. Wetzel (1985) afirmou que os animais desta espécie são considerados adultos quando atingem peso superior a 3,5 kg. Entretanto, preguiças fêmeas (*B. variegatus*) prenhas com peso inferior a 3,5 kg já foram encontradas. No

Recife, em uma autópsia realizada em uma fêmea, que veio a óbito espontâneo, com peso de 3,3 kg foi encontrado um pequeno feto (Gilmore e Da Costa, observações não publicadas, 1994). Isto indica que, pelo menos na fêmea desta espécie, a maturidade reprodutiva parece ser alcançada com um peso entre 3,0 e 4,0 kg. Este trabalho confirmou estas observações, uma vez que a fêmea que apresentou pico de P_4 pesava, em média, 3,8 kg (Figura 6 e Tabela 1); também corrobora para esta idéia o fato de que o peso médio da fêmea PG2, encontrada com filhote pelo IBAMA, foi de 3,3 kg (Figura 6 e Tabela 1).

Dados da literatura têm demonstrado que alguns animais podem ovular quando se encontram no período de gestação. Em lebres, *Lepus europaeus*, foi observado que o acasalamento no final da gestação, induz liberação do Hormônio Luteinizante (LH), com conseqüente ovulação e possível fecundação (MARTINET, 1980; CAILLOL et al., 1991). Caillol et al. (1991), estudaram 13 lebres fêmeas prenhas na presença de um macho, e constataram que 10 delas apresentaram superfetação, ou seja, concepção durante a gravidez. Hall, em 1987, evidenciou que superfetação em bovinos também pode ocorrer, inclusive relatou um caso dessa natureza. Outros animais também apresentaram tal fato, como: porcos (SINGH e MISHRA, 1979), Chinchilla, *Chinchilla laniger***,** (GITLIN e ADLER, 1969), ratos do tipo *Porton strain Wistar* (LAC-P) descrito por Sparrow em 1977, ovelha (SCANLON, 1972) e gato (HOOGEWEG e FOLKERS, 1970).

Como PG4, embora prenha, apresentou uma flutuação hormonal característica de ciclo ovulatório, sugerindo que possa ter ocorrido ovulação, estudos nesta área poderão ser realizados de modo a investigar a existência de superfetação nesta espécie, como evidenciado em outros mamíferos.

Este trabalho validou, portanto, a utilização do método não invasivo para estudos em preguiças, demonstrando a viabilidade de se detectar a ovulação nestes animais por intermédio da análise das fezes, permitindo o estudo dos mesmos com o mínimo de interferência humana. Tal possibilidade abre caminhos para que, no futuro, outras pesquisas venham ser realizadas nesta área.

Sabendo-se que algumas espécies de preguiças, como *B. torquatus*, estão em vias de extinção, cresce a importância do surgimento de técnicas válidas para o estudo do sistema reprodutor destes animais, minimizando a exposição das preguiças a infecções e outras complicações decorrentes da monitorização com intervenção invasiva. Assim, em face dos resultados obtidos, este trabalho, por utilizar e validar esta técnica não invasiva para monitorizar os níveis hormonais em preguiças através de suas fezes, é pioneiro, fornecendo importante contribuição ao estudo da fisiologia endócrina em *Bradypus variegatus*.

A pesquisa, ora iniciada, pode servir de base para que outras a sucedam com êxito e auxiliem na preservação deste animal que habita o planeta desde antes do surgimento do Homem.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos em preguiças, *Bradypus variegatus*, fêmeas, mantidas em cativeiro, permitiram as seguintes conclusões:

- A técnica de dosagem de metabólitos gonadais fecais foi validada, tornando possível dosar com fidedignidade estes hormônios nesta espécie;
- Existem flutuações nos níveis dos metabólitos fecais do estradiol e da progesterona, sugerindo ovulação e formação do corpo lúteo;
- O ciclo estral apresenta-se, nesta espécie, similar ao observado em outros mamíferos, embora a duração do mesmo não tenha sido determinada neste trabalho;
- O tempo gestacional, nesta espécie, tem duração superior a sete meses, existindo evidências de que há produção de hormônios gonadais pela placenta;
- A freqüência de defecação foi, em média, duas vezes por semana, em dias alternados, diferindo dos dados da literatura.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, A. C. S. R.; SOUSA, M. B. C.; SANTOS, H. M.; ZIEGLER, T. E. Behavioral and hormonal analysis of social relationships between oldest females in a wild monogamous group of common marmosets (*Callithrix jacchus*). **International Journal of Primatology.** v. 22, n. 4, p.631-645, 2001.

AMORIM, M. J. A. A. L. **A Placenta da Preguiça, Bradypus variegatus, Schinz, 1825.** 2000. 78 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

BARRETT, G. M.; SHIMIZU, K.; BARDI, M.; MORI, A. Fecal testosterone immunoreactivity as a non-invasive index of functional testosterone dynamics in male Japanese macaques (*Macaca fuscata*). **Primates**, v. 43, n. 1, p. 29-39, 2002.

BEEBE, W. The three-toed sloth. *Bradypus cuculinger.* Wagler. **Zoologica**, v.7, p.1-67, 1926.

BERKELEY, E. V. Fecal steroid hormone analysus of ovulation and pregnancy in the black rhinoceros (*Diceros bicornis*). **MS Thesis**. Ohio State University, Colombus, OH, 1994.

BOINSKI, S.; SWING, S. P.; GROSS, T. S.; DAVIS, J. K. Environmental enrichment of brown capuchins (*Cebus apella*): behavioral and plasma and fecal cortisol measures of effectiveness. **American Journal of Primatology**, v. 48, p. 49-68, 1999.

BORJESSON, D. L.; BOYCE, W. M.; GARDNER, I. A.; De FORGE, J.; LASLEY, B. Pregnancy detection in bighorn sheep (*Ovis canadensis*) using a fecal-based enzyme immunoassay. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 32, n. 1, p. 67-74, 1996.

BRITTON, S. W. Form and function in the sloth. **Quarterly Review of Biology**, v.16, p. 190-207, 1941.

BROWN, J. L.; WASSER, S. K..; HOWARD. J. G.; WELLS, S.; LANG, K.; COLLINS, L. Development and utility of fecal progesterone analysis to assess reproductive status in felids. **Proceedings American Association of Zoo Veterinarians**, p. 273-276, 1993.

BROWN, J. L.; WASSER, S. K.; WILDT, D. E.; GRAHAM, L. H. Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured noninvasively in feces. **Biology of Reproduction**, v. 51, p. 776-786, 1994.

BROWN, J. L.; WILDT, D. E.; WIELEBNOWSKI, N.; GOODROWE, K. L.; GRAHAM, L. H.; HOWARD. J. G. Reproductive activity in captive female cheetahs (*Acinonyx jubatus*) assessed by faecal steroids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.106, p. 337-346, 1996

CABRAL, M. C. C. S.; LIMA, T. M. O. **Compilação sobre a Mastofauna do Estado de Pernambuco.** 2000. 65 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2000.

CAILLOL, M.; MONDAIN-MONVAL, M.; ROSSANO, B. Gonadotrophins and sex steroids during pregnancy and natural superfetation in captive brown hares (*Lepus europaeus*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 92, n. 2, p. 299-306, 1991.

CAMPBELL, C. J.; SHIDELER, S. E.; TODD, H. E.; LASLEY, B. L. Fecal analysis of ovarian cycles in female black-handed spider monkeys (*Ateles geoffroyi*). **American Journal of Primatology**, v. 55, p. 79-89, 2001.

CAROSI, M.; HEISTERMANN, M.; VISALBERGHI, E. Display of proceptive behaviors in relation to urinary and fecal progestin levels over the ovarian cycle in female tufted capuchin monkeys. **Hormones and Behavior**, v.36, p. 252-265, 1999.

CAVIGELLI, S. Behavioural patterns associated with faecal cortisol levels in free-ranging female ring-tailed lemurs. *Lemurs catta*. **Animal Behaviour**, v. 57, p. 935-944, 1999.

CHARD, T. An introduction to radioimmunoassay and related techniques. **Elsevier**, Amsterdam, 1989.

COUBROUGH, R. I. Stress and fertility. A review. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, **v**. 52, p. 153-156, 1985.

CZEKALA, N. M.; DURRANT, B. S.; CALLISON, L.; WILLIAMS, M.; MILLARD, S. Fecal steroid hormone analysis as an indicator of reproductive function in the cheetah. **Zoo Biology**, v. 13, p. 119-128, 1994.

DARBRE, P.; YATES, J.; CURTIS, S.; KING, R. J. B. Effect of estradiol on human breast cancer cells in culture. **Cancer Research**, v.43, p.349-354, 1983.

DEHNHARD, M.; CLAUSS, M.; LECHNER-DOLL, M.; MEYER, H. H. D.; PALME, R. Noninvasive monitoring of adrenocortical activity in roe deer (*Capreolus capreolus*) by measurement of fecal cortisol metabolites. **General and Comparative Endocrinology**, v. 123, p. 111-120, 2001.

DINIZ, L. D. S. M; OLIVEIRA, M. A. Clinical problems of sloths (*Bradypus sp.* And *Choloepus sp.*) in captivity. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 30, n.1, p. 76-80, 1999.

DOBSON, H.; SMITH, R. F. What is stress, and how does it affect reproduction? **Animal Reproduction Science**, v. 60, n. 61, p. 743-752, 2000.

DUARTE, D. P. F.; DA COSTA, C. P.; HUGGINS, S. E. The effects of posture on blood pressure and heart rate in the three-toed sloth. **Comparative Biochemistry Physiology**, v. 73A, n. 4, p. 697-702, 1982.

FIESS, M.; HEISTERMANN, M.; HODGES, J. K. Patterns of urinary and fecal steroid excretion during the ovarian cycle and pregnancy in the African elephant (*Loxodonta africana*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 115, p. 76-89, 1999.

FUJITA, S.; MITSUNAGA, F.; SUGIURA, H.; SHIMIZU, K. Measurement of urinary and fecal steroid metabolites during the ovarian cycle in captive and wild Japanese macaques, *Macaca fuscata.* **American Journal of Primatology**, v. 53, p. 167-176, 2001.

GILMORE, D. P., DA COSTA, C. P., CABRAL, A. DUARTE D. P. F., MONTGOMERY, I.; WILSON, C. A. Further studies on reproductive function in the three-toed sloth. *Bradypus tridactylus*. **Medical Science Research**, v. 22, p. 255-256, 1994.

GILMORE, D. P.; DA COSTA, C. P. The three-toed sloth in biomedical research: an update on the reproductive and endocrine systems. **Medical Science Research**. v. 23, p. 579-581, 1995.

GILMORE, D. P.; DA COSTA, C. P.; VALENCA, M., DUARTE, D. P. F., WILSON, C. A.; GRAY, C. E. Effects of exogenous LHRH on plasma LH and sex steroid levels in the three-toed sloth *Bradypus tridactylus*. **Medical Science Research**, v.19, p. 333-335, 1991.

GILMORE, D. P.; DA-COSTA, C. P.; DUARTE, D. P. F. An update on the physiology of two- and three-toed sloths. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v .33, p. 129–146, 2000.

GITLIN, G.; ADLER, J. H. Coexisting intrauterine and abdominal (intraperitoneal) pregnancy with possible superfoetation (superfecundation) and with adhesion of placenta to foetus in a Chinchilla (*Chinchilla laniger*). **Acta Zoologica et Pathologica Antverpiensia**, v. 49, p. 65-76, 1969.

GOFFART, M. **Function and form in the sloth**. Oxford. Pergamon Press, 1971, 225p.

GOYMANN, W.; MÖSTL, E.; VAN'T HOF, T.; EAST, M. L.; HOFER, H. Noninvasive fecal monitoring of glucocorticoids in spotted hyenas, *Crocuta crocuta*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 114, p. 340-348, 1999.

GRAHAM, L. H.; REID, K.; WEBSTER, T.; RICHARDS, M.; JOSEPH, S. Endocrine patterns associated with reproduction in the Nile hippopotamus (*Hippopotamus amphibius*) as assessed by fecal progestagen analysis. **General and Comparative Endocrinology**, v. 128, p.74-81, 2002.

GRASSÉ, P. P. Ordre des Edentés. Sous-ordre des Xénarthres. **Traité de Zoologie**, v. 7, II, p. 1182-1266, 1955.

GUDERMUTH, D. F.; CONCANNON, P. W.; DAELS, P. F.; LASLEY, B. L. Pregnancy-specific elevations in fecal concentrations of estradiol, testosterone and progesterone in the domestic dog (*Canis familiaris*). **Theriogenology**, v. 50, p. 237-248, 1998.

HALL, W. H. Bovine superfetation by natural conception secondary to an embryo transfer pregnancy. **Cornell Veterinary**, v. 77, n. 3, p. 282-283, 1987.

HAY, M. A.; KING, W. A.; GARTLEY, C. J.; GOODROWE, K. L. Correlation of periovulatory serum and fecal progestins in the domestic dog. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 64, p. 59-63, 2000.

HEISTERMANN, M.; TARI, S.; HODGES, J. K.. Measurement of faecal steroids for monitoring ovarian function in New World primates, Callitrichidae. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 99, p. 243-251, 1993.

HEUSER, C. H.; WISLOCKI, G. B. Early development of the sloth (*Bradypus griseus*) and its similarity to that of man. **Carnegie Institute of Washington Publication.** n° 459. Contrib. to Embryology, v. 25, n. 144, p.1-13, 1935.

HOOGEWEG, J. H.; FOLKERS, E. R. Jr. Superfetation in a cat. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 156, n. 1, p. 73-75, 1970.

ISHIKAWA, A.; KIKUCHI, S.; KATAGIRI, S.; SAKAMOTO, H.; TAKAHASHI, Y. Efficiency of fecal steroid hormone measurement for assessing reproductive function in the Hokkaido brown bear (*Ursus arctos yesoensis*). **Japanese Journal of Veterinary Research**, v. 50, n. 1, p. 17-27, 2002.

JURKE, M. H.; CZEKALA, N. M.; FITCH-SNYDER, H. Non-invasive detection and monitoring of estrus, pregnancy and the postpartum period in pygmy loris (*Nycticebus pygmaeus*) using fecal estrogen metabolites. **American Journal of Primatology**, v. 41, p. 103-115, 1997.

KAPKE, C. A.; ARCESE, P.; ZIEGLER, T. E.; SCHEFFLER, G. R. Estradiol and progesterone metabolite concentration in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) feces. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 30, n. 3, p. 361-371, 1999.

KHAN, M. Z.; ALTMANN, J.; ISANI, S. S.; YU, J. A matter of time: evaluating the storage of fecal samples for steroid analysis. **General and Comparative Endocrinology**, v. 128, p. 57-64, 2002.

KING, B. F.; PINHEIRO, P. B. N.; HUNTER, R. L. The fine structure of the placental labyrinth in the sloth, *Bradypus tridactylus.* **The Anatomical Record**, v. 202, p. 15-22, 1982.

LANGWORTHY, O. R. A physiological study of the cerebral motor cortex and the control of posture in the sloth. **Journal of Comparative Neurology**, v. 62, n. 2, p. 333-348, 1935.

LI, C.; JIANG, Z.; JIANG, G.; FANG, J. Seasonal changes of reproductive behavior and fecal steroid concentrations in Père David´s deer. **Hormones and Behavior**, v. 40, p. 518-525, 2001.

LYNCH, J. W.; KHAN, M. Z.; ALTMANN, J.; NJAHIRA, M. N.; RUBENSTEIN, N. Concentrations of four fecal steroids in wild baboons: short-term storage conditions and consequences for data interpretation. **General and Comparative Endocrinology**, v.132, p.264-271, 2003.

LYNCH, J. W.; ZIEGLER, T. E.; STRIER, K. B. Individual and seasonal variation in fecal testosterone and cortisol levels of wild male tufted capuchin monkeys, *Cebus apella nigritus.* **Hormones and Behavior**, v. 41, p. 275-287, 2002.

MARSHALL, J. C. Hormonal regulation of the menstrual cycle and mechanisms of anovulation. In: DeGROOT, L. J. **Endocrionology**. 3ª ed. W. B. Saunders Company. Philadelphia, 1995. p. 2046-2058.

MARTINET, L. Oestrous behavior, follicular growth and ovulation during pregnancy in the hare (*Lepus europaeus*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 59, n. 2, p. 441-445, 1980.

MARTINS, J. A. P. **Placentologia: placenta – membranas – cordão umbilical**. Livraria Roca Ltda. São Paulo, SP, 1986. 218 p.

MATSUMURO, M.; SANKAI, T.; CHO, F.; YOSHIKAWA, Y.; YOSHIDA, T. A two-step extraction method to measure fecal steroid hormones in female cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). **American Journal of Primatology**, v. 48, p. 291-298, 1999.

MCNAB, B. K. Energetics, population biology, and distribution of Xenarthrans, living and extinct. In: G. G. Montgomery (Ed.). **The Evolution and Ecology of Armadillos, Sloths and Vermilinguas.** Washington and London: Smithsonian Institution Press, p. 219-232, 1985.

MONTGOMERY, G. G.; SUNQUIST, M. E. Habitat selection and use by two-toed and three-toed sloths. p. 329-359 In: **Ecology of Arboreal Folivores**, G.G. Montgomery (Editor), Smithsonian University Press, Washington D.C. 1978. 573p.

MONTGOMERY, G. G.; SUNQUIST, M. E. Impact of sloths on neotropical energy flow and nutrient cycling. p 69-98 In: **Trends in Tropical Ecology**; Ecological Studies IV. E. Medina & F. Golly (Editors), Springer-Verlag, New York Inc., New York, 1975. 398p.

MOORMAN, E. A.; MENDOZA, S. P.; SHIDELER, S. E.; LASLEY, B. L. Excretion and measurement of estradiol and progesterone metabolites in the feces and urine of female squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). **American Journal of Primatology**, v. 57, p. 79-90, 2002.

MOREIRA, N.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A.; MORAES, W.; SWANSON, W. F.; GRAHAM, L. H.; PASQUALI, O. L.; GOMES, M. L. F.; MORAIS, R. N.; WILDT, D. E.; BROWN, J. L. Reproductive steroid hormones and ovarian activity in felids of *Leopardus* genus. **Zoo Biology**, v. 20, p. 103-116, 2001.

MUIR, C.; SPIRONELLO-VELLA, E.; PISANI, N.; de CATANZARO, D. Enzyme immunoassay of 17β-estradiol, estrone conjugates, and testosterone in urinary and fecal samples from male and female mice. **Hormone and Metabolic Research**, v. 33, p. 653-658, 2001.

NAGY, K. A.; MONTGOMERY, G. G. Field metabolic rate, water flux, and food consumption in three-toed sloths (*Bradypus variegatus*). **Journal of Mammalogy**, v. 61, p. 465-472, 1980.

ONUMA, M.; SUZUKI, M.; UCHIDA, E.; NIIYAMA, M.; OHTAISHI, N. Annual changes in fecal estradiol-17β concentrations of the sun bear (*Helarctos malayanus*) in Sarawak, Malaysia. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 64, n. 4, p. 309-313, 2002.

OZORIO DE ALMEIDA, A.; BRANCA DE FIALHO, A. Metabolisme, température et quelques autres déterminations physiologiques faites sur lê Paresseux (*Bradypus tridactylus*). **Comptes Rendus de la Societe de Biologie**, v. 91, p. 1124-1125, 1924.

REDDEL, R. R.; MURPHY, L. C.; SUTHERLAND, R. L. Factors affecting the sensitivity of T-47 human breast cancer cells to tamoxifen. **Cancer Research**, v. 44, p. 2398-2405, 1984.

RICHTER, C. P.; BARTEMEIER, L. H. Decerebrate rigidity of the sloth. **Brain**, v. 49, p. 207-225, 1926.

SANDERS, H.; RAJAMAHENDRAN, R.; BURTON, B. The development of a simple fecal immunoreactive progestin assay to monitor reproductive function in swine. **Canadian Veterinary Journal**, v. 35, p. 355-358, 1994.

SCANLON, P. F. An apparent case of superfoetation in a ewe. **Australian Veterinary Journal**, v. 48, n. 2, p. 74, 1972.

SCHLOBIES, L.; PAN, R.; HUANG, C-C.; FENTON, K.; GILL, H. Hyperactive sloths leads to isolation of a new compound. **Nature**, v. 415, p. 888-891, 2001.

SCHOLANDER, P. F.; KROG, J. Countercurrent heat exchange and vascular bundles in sloths. **Journal of Applied Physiology**, v. 10, p. 405-411, 1957.

SCHWARZENBERGER, F.; MÖSTL, E.; BAMBERG, E.; VON HEGEL, G. Monitoring of corpus luteum function by measuring progestagens in faeces of non-pregnant mares (*Equus caballus*) and Przewalski mares (*Equus przewalskii*). **Animal Reproduction Science**, v. 29, p. 263-273, 1992.

SCHWARZENBERGER, F.; MÖSTL, E.; PALME, R.; BAMBERG, E. Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 515-526, 1996.

SCHWARZENBERGER, F.; PALME, R.; BAMBERG, E.; MÖSTL, E. A review of faecal progesterone metabolite analysis for non-invasive monitoring of reproductive function in mammals. **Journal of Mammalian Biology**, v. 62, p. 214-221, 1997.

SCHWARZENBERGER, F.; RIETSCHEL, W.; VAHALA, J.; HOLECKOVA, D.; THOMAS, P.; MALTZAN, J.; BAUMGARTNER, K.; SCHAFTENAAR, W. Fecal progesterone, estrogen, and androgen metabolites for noninvasive monitoring of reproductive function in the female Indian rhinoceros, *Rhinoceros unicornis*. **General and Comparative Endocrinology**, v.119, p. 300-307, 2000.

SHIDELER, S. E.; ORTUÑO, A. M.; MORÁN, F. M.; MOORMAN, E. A.; LASLEY, B. L. Simple extraction and enzyme immunoassays for estrogen and progesterone metabolites in the feces of *Macaca fascicularis* during non-conceptive and conceptive ovarian cycles. **Biology of Reproduction**, v. 48, p. 1290-1298, 1993.

SINGH, C. S.; MISHRA, H. R. A case of superfecundation in pig. **Indian Veterinary Journal**, v. 56, n. 4, p. 338, 1979.

SOUSA, M. B. C.; ZIEGLER, T. E. Diurnal variation on the excretion patterns of fecal steroids in common marmoset (*Callithrix jacchus*) females. **American Journal of Primatology**, v. 46, p. 105-117, 1998.

SPARROW, S. Naturally occurring superfoetation in the rat. **Laboratory Animal**. v. 11, n. 1. p. 49-50, 1977.

TAUBE, E.; KERAVEC, J.; VIÉ, J-C.; DUPLANTIER, J-M. Reproductive biology and postnatal development in sloths, *Bradypus* and *Choloepus*: review with original data from the field (French Guiana) and from captivity. **Mammal Review**, v. 31, n. 3, p. 173-188, 2001.

THOMPSON, K. V.; MASHBURN, K. L.; MONFORT, S. L. Characterization of estrous cyclicity in the sable antelope (*Hippotragus niger*) through fecal progestagen monitoring. **General and Comparative Endocrinology**, v. 112, p. 129-137, 1998.

TOYAMA Y.; CALDERON, F. U.; QUESADA, R. Ultrastructural study of crystalloids in Sertoli cells of the three-toed sloth (*Bradypus tridactylus*). **Cell and Tissue Research**, v. 259, p. 599-602, 1990.

TURNER, J. W.; TOLSON, P.; HAMAD, N. Remote assessment of stress in white rhinoceros (*Ceratotherium simum*) and black rhinoceros (*Diceros bicornis*) by measurement of adrenal steroids in feces. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 33, n. 3, p. 214-221, 2001.

VOGEL, I.; VIÉ, J-C.; THOISY, B.; MOREAU, B. Hematological and serum chemistry profiles of free-ranging southern two-toed sloths in French Guiana. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 35, n. 3, p. 531-535, 1999.

VOS, E. A.; VAN OORD, R.; TAVERNE, M. A. M.; KRUIP, A. M. Pregnancy diagnosis in sows: direct ELISA for estrone in feces and its prospects for an on-farm test, in comparison to ultrasonography. **Theriogenology**, v. 51, p. 829-840, 1999.

WALLACE, C.; OPPENHEIM, Y. C. Hematology and serum chemistry profiles of captive Hoffmann's two-toed sloths (*Choloepus hoffmanni*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 27, p. 339-345, 1996.

WASSER, S. K.. Reproductive control in wild baboons measured by fecal steroids. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 393-399, 1996.

WASSER, S. K.; MONFORT, S. L.; WILDT, D. E. Rapid extraction of faecal steroids for measuring reproductive cyclicity in early pregnancy in free-ranging yellow baboons (*Papio cynocephalus cynocephalus).* **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 92, p. 415-423, 1991.

WASSER, S. K.; PAPAGEORGE, S.; FOLEY, C.; BROWN, J. L. Excretory fate of estradiol and progesterone in the African elephant (*Loxodonta africana*) and patterns of fecal steroid concentrations throughout the estrous cycle. **General and Comparative Endocrinology**, v. 102, p. 255-262, 1996.

WASSER, S. K.; RISLER, L.; STEINER, R. A. Excreted steroids in primate feces over the menstrual cycle and pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 39, p. 862-872, 1988.

WETZEL, R. M. Systematics, distribuition, ecology and conservation of South American edentates. In: **Mammalian Biology in South America.** M.A. Mares e H.H. Genoways, Pittsburgh: University of Pittsburgh, v. 6, p. 345-372, 1982.

WETZEL, R. M. The identification and distribution of recent XENARTHRA (= EDENTATA) of Brazil. In: G. G. Montgomery (Ed.). **The evolution and ecology of armadillos, sloth and vermilinguas.** Smithsonian Institution Press, Washington, p. 5-21, 1985.

WETZEL, R. M.; ÁVILA-PIRES, F. D. Identification and distribution of the recent sloths of Brazil (Edentata). **Revista Brasileira de Biologia**, v.40, n. 4, p.831-836, 1980.

WHITTEN, P. L.; BROCKMAN, D. K.; STAVISKY, R. C. Recent advances in noninvasive techniques to monitor hormone-behavior interactions. **Yearbook of Physical Anthropology**, v. 41, p.1-23, 1998.

WISLOCKI, G. B. Observations on the gross and microscopic anatomy of the sloth (*Bradypus griseus griseus* Gray and *Choloepus hoffmanni* Peters). **Journal of Morphology and Physiology**, v. 46, p. 317-377, 1928.

ZIEGLER, T. E.; HODGES, K.; WINKLER, P.; HEISTERMANN, M. Hormonal correlates of reproductive seasonality in wild female Hanuman langurs (*Presbytis entellus*). **American Journal of Primatology**, v. 51, p. 119-134, 2000.

ZIEGLER, T. E.; SCHEFFLER, G.; CARLSON, A. A. Methods and use of fecal steroid analyses for monitoring reproductive functioning in marmosets and tamarins. **A Primatologia no Brasil***,* v. 6, p. 269-280, 1997.

ZIEGLER, T. E.; SCHEFFLER, G.; WITTWER, D. J.; SCHULTZ-DARKEN, N.; SNOWDON, C. T.; ABBOTT, D. H. Metabolism of reproductive steroids during the ovarian cycle in the two species of callitrichids, *Saguinus oedipus* and *Callithrix jacchus*, and estimation of the ovulatory period from fecal steroids. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 91-99, 1996.

ZUGAIB, M.; KANAS, M. **Fisiologia fetal aplicada**. Livraria Roca Ltda. São Paulo, SP, 1986. 240 p.

ANEXO I

DEFECAÇÃO (Def.), COLETA DE TEMPERATURA RETAL E PESO CORPORAL NA PREGUIÇA 1 RELACIONADOS COM O DIA E TURNO DURANTE OS MESES DE COLETA FECAIS

MÊS	MARÇO				ABRIL				MAIO				JUNHO				JULHO				AGOSTO				SETEMBRO			
Dia	Def	Turno	Temp Retal (ºC)	Peso (kg)	Def	Turno	Temp Retal (ºC)	Peso (kg)	Def	Turno	Temp Retal (ºC)	Peso (kg)	Def	Turno	Temp Retal (ºC)	Peso (kg)	Def	Turno	Temp Retal (ºC)	Peso (kg)	Def	Turno	Temp Retal (ºC)	Peso (kg)	Def	Turno	Temp Retal (ºC)	Peso (kg)
1																	*X	T										
2																									*X	M	33	3,32
3					X	M															*X	T						
4					X	M			X	T															*X	M		
5																	X	T										
6									X	M			*X	T							*X	T	32	3,33				
7					X	M					35	3,06													*X	M		
8									X	T									33,5	3,44								
9					X	M											X	T			*X	M						
10					X	T			X	T															*X	M	32,5	3,29
11					X	T							X	T											*X	T		
12													*X	T							*X	M	33	3,39	*X	M		
13				3,09													X	T										
14	X	T			X	M			X	T																		
15													*X	T														
16					X	T																						
17	X	T							X	M							*X	T			*X	M						
18																												
19	X	T																			*X	T	33	3,49				
20					X	T											*X	T										
21			34	3,32					X	M																		
22									X	T			*X	T														
23					X	M											*X	T			*X	T						
24	X	T											*X	T					32	3,14	*X	T						
25					X	T																						
26																					*X	T	32	3,49				
27	X	M			X	T			X	M							X	T										

28	X	M											*X	T									
29				X	T				X	M	35	3,28											
30													X	M		*X	M	32,5	3,41	*X	T		
31	X	M							X	T						*X	T						

* amostra dosada M: 6h – 11h59 T: 12h – 17h59 N: 18h – 5h59

ANEXO II

DEFECAÇÃO (Def.), COLETA DE TEMPERATURA RETAL E PESO CORPORAL NA PREGUIÇA 2 RELACIONADOS COM O DIA E TURNO DURANTE OS MESES DE COLETA FECAIS

MÊS	SETEMBRO				OUTUBRO				NOVEMBRO				DEZEMBRO				JANEIRO				FEVEREIRO			
Dia	Def	Turno	Temp Retal (ºC)	Peso (kg)	Def	Turno	Temp Retal (ºC)	Peso (kg)	Def	Turno	Temp Retal (ºC)	Peso (kg)	Def	Turno	Temp Retal (ºC)	Peso (kg)	Def	Turno	Temp Retal (ºC)	Peso (kg)	Def	Turno	Temp Retal (ºC)	Peso (kg)
1									*X	M											*X	M		
2																								
3					*X	T											*X	M						
4									*X	T	31	3,2	*X	M							*X	T		
5					*X	T																		
6																			31,5	3,42	X	T		
7					*X	T							*X	M			X	M						
8					X	T																		
9									X	T													33	3,4
10							32,5	3,35									*X	M						
11									*X	T	29	3,2	*X	M										
12																	X	M	31	3,4				
13					*X	M			*X	T			*X	M										
14																								
15					*X	T	29	3,5					*X	M										
16					*X	T																		
17																	*X	M						
18																								
19																			32	3,5				
20																								
21					*X	T	33	3,3																
22									*X	M							*X	M						
23	X	T											*X	M										
24											29	3,05					*X	M						
25					*X	M																		
26			30	3,45																				
27	X	T											*X	M			*X	M	28	3,4				

28																
29	X	T					*X	M			*X	M				
30	*X	T	32	3,34			*X	M			*X	M		*X	M	
31						30	3,3									

* amostra dosada M: 6h – 11h59 T: 12h – 17h59 N: 18h – 5h59

ANEXO III

DEFECAÇÃO (Def.), COLETA DE TEMPERATURA RETAL E PESO CORPORAL NA PREGUIÇA 3 RELACIONADOS COM O DIA E TURNO DURANTE OS MESES DE COLETA FECAIS

MÊS	OUTUBRO				NOVEMBRO				DEZEMBRO				JANEIRO				FEVEREIRO			
Dia	Def	Turno	Temp Retal (ºC)	Peso (kg)	Def	Turno	Temp Retal (ºC)	Peso (kg)	Def	Turno	Temp Retal (ºC)	Peso (kg)	Def	Turno	Temp Retal (ºC)	Peso (kg)	Def	Turno	Temp Retal (ºC)	Peso (kg)
1	*X	M			*X	T			*X	T							*X	M		
2													*X	M						
3													*X	T			*X	T		
4	*X	T			*X	T							*X	M			*X	T		
5	*X	T															*X	T		
6					*X	T	29,5	2,65	*X	M					31	2,95	*X	T		
7			32	2,3	*X	T														
8					*X	T														
9	*X	M			*X	T			*X	T									31	2,85
10									*X	T										
11	X	M							*X	M							*X	M		
12					*X	T	31	2,4	*X	T			*X	M	31	3				
13																				
14	*X	M			*X	M			*X	T			*X	M						
15					*X	M														
16	*X	M	33	2,15									*X	M						
17									*X	T										
18	*X	T											*X	M						
19															30	3,2				
20	*X	T							*X	T			*X	M						
21	*X	M			*X	M														
22					*X	M			*X	T			*X	M						
23	*X	T	32	2,3					*X	M										
24	*X	M					29	2,8					*X	M						
25									*X	M										
26	*X	M			*X	T							*X	M						
27															28	3,05				
28					*X	T							*X	M						
29	*X	M			*X	T			*X	M										
30	*X	T							*X	T										
31																				

* amostra dosada M: 6h – 11h59 T: 12h – 17h59 N: 18h – 5h59

ANEXO IV

DEFECAÇÃO (Def.), COLETA DE TEMPERATURA RETAL E PESO CORPORAL NA PREGUIÇA 4 RELACIONADOS COM O DIA E TURNO DURANTE OS MESES DE COLETA FECAIS

MÊS	JANEIRO				FEVEREIRO				MARÇO			
Dia	Def	Turno	Temp Retal (ºC)	Peso (kg)	Def	Turno	Temp Retal (ºC)	Peso (kg)	Def	Turno	Temp Retal (ºC)	Peso (kg)
1									*X	M	31	3,7
2	*X	T			*X	M			*X	T		
3												
4	*X	T										
5												
6	*X	M	31,5	3,68								
7									*X	M		
8					*X	M					31	3,85
9	*X	M					31	3,7	*X	T		
10												
11	*X	M			*X	M						
12			31	3,75					*X	M		
13	*X	T										
14												
15					*X	T			*X	M	30	3,8
16	X	M							*X	M		
17	*X	M										
18	*X	T			*X	T			*X	M		
19			32	3,95					*X	M		
20	*X	M							X	M		
21	*X	T							X	M		
22											32	4
23	*X	T			*X	M			*X	M		
24												
25					*X	T						
26	*X	M					28	3,8				
27			27	4,15								
28	*X	M										
29	*X	T									31	4,05
30	*X	M										
31	*X	T										

* amostra dosada M: 6h – 11h59 T: 12h – 17h59 N: 18h – 5h59