



Concentração dos metabólitos de estradiol e progesterona fecais no cachorro-do-mato-vinagre (*Speothos venaticus*) (Lund, 1842) pelos métodos de radioimunoensaio e quimioluminescência

Estradiol and progesterone fecal metabolites concentration of bush dog (Speothos venaticus) (Lund, 1842) by radioimmunoassay and chemiluminescence methods

G.G. Lemos¹, I.C.N. Cunha^{1,3}, V.A. Conforti², R. Bastos¹, C.R. Quirino¹, M. R. Faes¹

¹Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

²Universidade de Franca, Franca, São Paulo, Brasil.

³Correspondência: cunhaicn@gmail.com

Resumo

Este trabalho objetivou comparar dois métodos de dosagem hormonal (quimioluminescência e radioimunoensaio) em extratos fecais liofilizados em cachorro-do-mato-vinagre (*Speothos venaticus*) para verificar qual fornece maior acurácia quanto aos resultados. Foram utilizadas 166 amostras fecais de duas fêmeas (fêmea A, n = 80 e fêmea B, n = 86) oriundas do Zoológico de Ilha Solteira/SP, coletadas no período de março a dezembro de 2005. As amostras foram liofilizadas, e extraíram-se os metabólitos hormonais fecais. As concentrações de estradiol e progesterona foram dosadas utilizando-se kits específicos para dosagem hormonal em humanos. Os resultados de ambos os métodos foram comparados (testes estatísticos). De acordo com os testes de Pearson e de Tukey, os métodos tiveram resultados compatíveis ($P > 0,05$). Não houve diferença significativa entre os métodos, mostrando que o monitoramento não invasivo de hormônios em extrato fecal contribuiu na determinação da concentração dos metabólitos de cada fêmea deste estudo. Este revela a adequação e a similaridade entre os métodos de quimioluminescência e radioimunoensaio para a quantificação dos metabólitos fecais de estradiol e de progesterona na espécie *Speothos venaticus*.

Palavras-chave: dosagem hormonal, fezes, quimioluminescência, radioimunoensaio, *Speothos venaticus*.

Abstract

The objective of this study was to compare two methods of hormone concentration assessment (chemiluminescence and radioimmunoassay) in lyophilized fecal extracts from bush dogs (*Speothos venaticus*) to verify which gives more accurate in results. One hundred and sixty-six fecal samples from two females (female A, n = 80 and female B, n = 86) at Ilha Solteira Zoo – SP, were collected from March through December 2005. Samples were lyophilized before fecal metabolite hormonal extraction. Estradiol and progesterone concentrations were assessed using commercially available kits for human hormone analyses. Both methods results were compared by (test statistics). According to Pearson and Tukey tests, the methods had comparable results ($P > 0,05$). There was no significant difference between methods, showing the non-invasive monitoring of fecal metabolite hormonal contributed to the determination of metabolites concentrations for each female in this study. It demonstrates the suitability and similarity of chemiluminescence and radioimmunoassay for quantification of estradiol and progesterone fecal metabolites in *Speothos venaticus* species.

Keywords: chemiluminescence, feces, hormone dosage, radioimmunoassay, *Speothos venaticus*.

Introdução

O conhecimento da biologia reprodutiva de uma espécie silvestre é um recurso importante para o manejo reprodutivo desta em cativeiro, contribuindo para a preservação em seu ambiente natural (Snyder et al., 1996).

O cachorro-do-mato-vinagre (*Speothos venaticus*), apesar de ter sido descrito pela primeira vez há menos de 200 anos (a partir de fósseis), já é considerado em risco de desaparecer na natureza, sendo encontrado de maneira isolada e em populações de densidade reduzida (De Oliveira, 2009).

Uma alternativa para reverter esse quadro é o estudo do ciclo reprodutivo da espécie, por meio técnicas de mensuração dos hormônios sexuais estrógeno e progesterona (Schwarzenberger, 2007).

Brown et al. (1996) concluíram que a dosagem hormonal tem grande potencial para ser uma valiosa ferramenta para acessar o status androgênico de espécies ameaçadas de extinção.

A avaliação do padrão hormonal em amostras fecais é de grande utilidade, uma vez que possibilita a verificação do caráter comportamental reprodutivo de espécies, sem o estresse gerado pela captura para a coleta



do material biológico, o qual interfere nas concentrações dos hormônios sexuais (Wasser et al., 2000) e pode ser verificado por meio de radioimunoensaio, bem como, após validada a metodologia, por quimioluminescência.

O teste de radioimunoensaio, apesar de bastante acurado, resulta em resíduos radioativos potencialmente tóxicos ao ambiente. A quimioluminescência vem ganhando força por ser mais simples, barata e não gerar resíduos radioativos; entretanto, testes que verifiquem a acurácia deste método devem ser desenvolvidos (De Boever et al., 1985).

A liofilização das amostras fecais é bastante utilizada, tendo como objetivo excluir a interferência da umidade durante a extração hormonal, nas amostras refrigeradas, o que proporciona a mudança de fase da água, de sólida para gasosa, e, assim, evita a degradação das amostras.

O presente trabalho teve como objetivo comparar a metodologia de dosagem hormonal no extrato fecal liofilizado de cachorro-do-mato-vinagre (*Speothos venaticus*) pelos métodos de radioimunoensaio e quimioluminescência, a fim de se verificar qual fornece maior acurácia quanto aos resultados.

Material e Métodos

Coleta de amostras fecais

Foram coletadas, no Zoológico de Ilha Solteira/SP (latitude: 20° 25' 52" sul, longitude: 51° 20' 17" oeste), 166 amostras de duas fêmeas de cachorro-do-mato-vinagre, de março a dezembro de 2005, e enviadas ao Núcleo de Apoio à Reprodução de Carnívoros (NuARC) do Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal (LRMGA) da UENF.

Oitenta amostras da fêmea A (Studbook # 1227) e 86 amostras da fêmea B (Studbook # 1118) foram identificadas e embaladas, cada uma em sacos plásticos do tipo Ziploc®, 8,5 x 12,5cm, e armazenadas congeladas a -20°C (Tab. 1).

Tabela 1. Identificação das fêmeas estudadas, relacionando peso e quantidade de amostras obtidas de cada indivíduo.

Animal (ID)	Studbook	Peso	Nº de amostras
Fêmea A	#1227	6,0	80
Fêmea B	#1118	4,8	86

Liofilização e extração hormonal das amostras fecais

A metodologia de extração utilizada neste trabalho é uma adaptação da técnica descrita por Brown et al. (1996).

As amostras foram liofilizadas a cerca de -50°C durante três dias consecutivos, utilizando-se dois tipos de liofilizadores (Delta 1-30K, da marca Christ, Munique, Alemanha, e L101, da marca Liotop, São Paulo, Brasil). Após serem retiradas do liofilizador, ainda dentro do saco Zip, as amostras foram trituradas manualmente a fim de serem pulverizadas. Aproximadamente 0,2g de cada amostra foi acondicionado em tubos de vidro com tampas rosqueadas, os quais foram identificados. A extração ocorreu quando foram adicionados 5mL de etanol a 90% (diluído em 10% de água destilada), e, com o auxílio de um Vortex (QL Vortex 901, da marca Biomixer, EUA), esse material foi misturado por 20 segundos.

Após esse procedimento, os tubos foram colocados no homogeneizador (Homogeneizador de Sangue AP 22, Phoenix - EUA), por 12h (*overnight*). Em seguida, as amostras foram centrifugadas (2500 x rpm por 20min a 4°C). O volume de 5mL do sobrenadante de cada amostra foi retirado com auxílio de uma pipeta de Pasteur e envasado em dois tubos tipo *Eppendorf* de 1,5mL (duplicatas) do extrato fecal, mantido em congelação (-20°C) até o momento da dosagem hormonal.

Dosagens hormonais

Método de quimioluminescência

O método de quimioluminescência foi utilizado para executar as dosagens dos hormônios progesterona e estradiol de extratos fecais, determinadas pelo Setor de Endocrinologia do Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal (LRMGA) da UENF, por meio do sistema automatizado Immulite I®, Siemens Healthcare Diagnostics Ltd. (Los Angeles, CA, USA).

Os procedimentos laboratoriais foram realizados de acordo com a metodologia proposta pelo fabricante.

A concentração de cada amostra dada pelo aparelho (em ng/mL de extrato fecal para progesterona e pg/mL de extrato fecal para estradiol) foi multiplicada pelo fator de diluição da amostra em água destilada (executada antes das dosagens) e, em seguida, multiplicou-se por 5 (5mL de etanol adicionado na extração). Como resultado final, dividiu-se cada um desses valores pelo seu respectivo peso (em gramas), medido após



liofilização e maceração, sendo a unidade para progesterona dada em ng/g de fezes liofilizadas e para estradiol dada em pg/g de fezes liofilizadas. O mesmo cálculo foi executado no radioimunoensaio.

Na dosagem de progesterona, as amostras foram diluídas a uma concentração de 20% (v/v) em água destilada, sendo pipetado, nos copos numerados do equipamento, um volume total de 200 μ L (40 μ L da amostra + 160 μ L de água destilada) para cada amostra.

Assim, procedeu-se à leitura por meio do Immulite I[®], Siemens Healthcare Diagnostics Ltd. (Los Angeles, CA, USA). A conversão das concentrações de progesterona dos extratos fecais foi expressa em ng/g de fezes.

Na dosagem de estradiol, as amostras foram diluídas a uma concentração de 10% (v/v) em água destilada, sendo pipetado, nos copos numerados do equipamento, um volume total de 200 μ L (20 μ L da amostra + 180 μ L de água destilada) para cada amostra.

Algumas amostras foram novamente dosadas, pois obtiveram concentrações acima ou abaixo dos limites de detecção do aparelho. Assim, foram feitas novas dosagens com diluições diferentes (Tab. 2).

Tabela 2. Amostras e diluições correspondentes, cujas concentrações obtidas pela diluição a 10% (v/v) apresentaram-se acima ou abaixo dos limites de detecção do aparelho, utilizadas na dosagem de estradiol (E2) pelo método de quimioluminescência.

Número de identificação da amostra	Diluições
1, 4, 72, 90, 98 e 141.	5% (10 μ L da amostra + 190 μ L de água destilada)
2, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 13, 14, 15, 16, 20, 24, 26, 31, 40, 41, 46, 50, 53, 73, 78, 80, 91, 103, 122, 124, 128 e 142	20% (40 μ L da amostra + 160 μ L de água destilada)

Assim, procedeu-se à leitura por meio do Immulite I[®], Siemens Healthcare Diagnostics Ltd. (Los Angeles, CA, USA). A conversão das concentrações de estradiol dos extratos fecais foi expressa em pg/g de fezes.

Método de radioimunoensaio (RIE)

As concentrações de progesterona e estradiol dos extratos fecais foram determinadas no Setor de Comportamento e Bem-estar Animal do Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal (LRMGA) da UENF. As concentrações de progesterona e estradiol foram determinadas pela técnica de radioimunoensaio em fase sólida, sendo utilizado o conjunto diagnóstico comercial da Immunotech[®] Beckman Coulter Laboratories (Marseille, France).

Para a construção da curva de calibração, na dosagem da progesterona, foram rotulados:

- quatro tubos de polipropileno (não revestido com anticorpo) de 12 x 75mm para as contagens totais (T) e ligações não específicas (NSB) em duplicatas;
- 18 tubos revestidos com anticorpos de progesterona, sendo: dois tubos para P₀ (ligação máxima com o anticorpo para a progesterona na ausência do padrão ou desconhecido) e dois tubos para cada calibrador (padrão) em ordem crescente, correspondendo do padrão 1 (P₁ - 0,025ng/mL) ao padrão 8 (P₈ - 45ng/mL);
- dois tubos utilizados para o controle do ensaio, de valor conhecido, fornecido pelo fabricante;
- 75 tubos (primeiro ensaio) e 182 tubos (segundo ensaio) revestidos com anticorpos de progesterona para as amostras dos extratos fecais.

Após a rotulagem dos tubos descrita acima, foram pipetados 50 μ L do calibrador A nos tubos NSB e P₀; 50 μ L dos calibradores remanescentes (padrões de P₁ a P₈); 50 μ L dos controles e 50 μ L das amostras.

Em todos os tubos, foi adicionado 0,5mL de progesterona ¹²⁵I 10 minutos após serem pipetados os calibradores (padrão), os controles e as amostras. Os tubos foram agitados em *shaking* vertical de velocidade de 200rpm, durante uma hora, à temperatura ambiente. Após esse período, todo o líquido contido nos tubos foi aspirado por uma bomba a vácuo, exceto os tubos T (contagens totais). A leitura foi realizada por meio do contador gama Wizard 2470, Perkin Elmer (EUA).

Foram realizados dois ensaios. O controle de qualidade do RIE foi realizado pelo coeficiente de variação intraensaio para cada ensaio, sendo de 0,70% e de 0,16%, e o coeficiente de variação interensaio foi de 0,5%. A sensibilidade mínima detectada para os dois ensaios foi de 0,01ng/mL. Após as dosagens, foi realizada a conversão das concentrações de progesterona dos extratos fecais e esta expressa em ng/g de fezes.

Para a dosagem de estradiol pelo método de RIE, o estradiol ¹²⁵I foi diluído em 54mL, em tampão fosfato contendo azida sódica.

Para a construção da curva de calibração, foi rotulada como descrito na dosagem de progesterona, porém: o passo A foi feito em triplicatas; no passo B, os valores são padrão 1 (P₁ - 6,0pg/mL) a padrão 8 (P₈ -

5017pg/mL); foram pipetados 100µL dos calibradores, dos controles e das amostras, em vez de 50µL, nos tubos a serem lidos pelo contador; e os tubos foram agitados durante três horas.

O controle de qualidade do RIE foi realizado pelo coeficiente de variação intraensaio, sendo de 0,7%. A sensibilidade mínima detectada para o ensaio foi de 4pg/mL.

As concentrações de estradiol dos extratos fecais seguem o mesmo cálculo feito na quimioluminescência, expressas em pg/g.

Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados por meio do programa SAS System for Windows (SAS, 2000).

Para a descrição dos resultados, foram calculadas as médias mensais e seus respectivos desvios-padrão das concentrações dos hormônios estradiol e progesterona obtidas de cada fêmea, em ambos os métodos de dosagem hormonal, sendo executada a estatística descritiva (Tukey).

A análise de correlação de Pearson foi utilizada para verificar a relação entre os métodos de análise hormonal. A análise de variância foi realizada com os dados obtidos de cada animal nas quatro características analisadas para se verificar se houve diferença devido ao efeito do mês (concentrações de progesterona na quimioluminescência e no radioimunoensaio; concentrações de estradiol na quimioluminescência e no radioimunoensaio).

Resultados

Para a fêmea B, a variação das concentrações de progesterona pelo método de radioimunoensaio foi de 56,37 a 915,84ng/g.

Já para as concentrações de progesterona obtidas da fêmea A pelo método de radioimunoensaio, foram observadas variações com um intervalo menor, de 44,78 a 858,59ng/g.

Já as concentrações de progesterona da fêmea A, neste mesmo método, revelam que as maiores taxas foram detectadas nas coletas 50 (setembro) e 57 (outubro), com concentrações de 6.055,28 e 3.200,00ng/g, respectivamente. Isso pode indicar que, nesses momentos referentes às coletas 50 e 57, a fêmea A poderia estar em uma fase luteal, de acordo com as concentrações de progesterona.

A Fig. 2 permite a observação, pelo método de radioimunoensaio, das maiores concentrações de estradiol ocorridas nas coletas 5 (abril), 60 (outubro) e 67 (novembro), com concentrações de 52,96; 54,29 e 72,50pg/g, respectivamente.

Essas amostras também são as maiores elevações, quando comparadas com a figura da dosagem hormonal pelo método de quimioluminescência (Fig. 1) na mesma fêmea. Dessa forma, ambos os métodos são coincidentes, visto que foram detectadas as maiores concentrações nas mesmas amostras fecais.

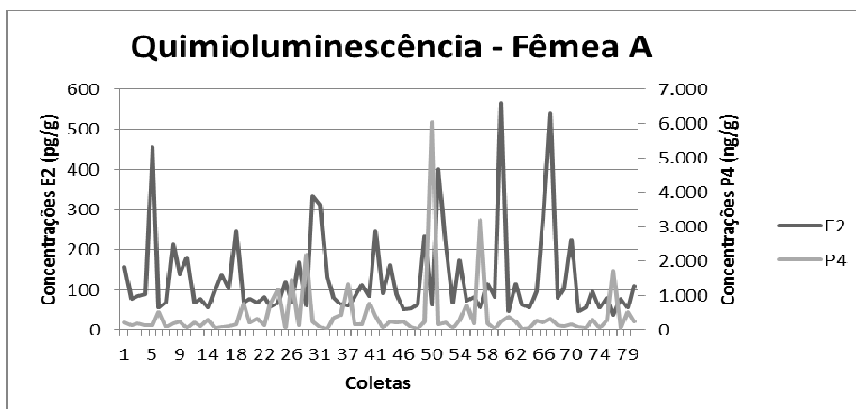


Figura 1. Concentrações hormonais de progesterona (P4) e estradiol (E2) encontradas em extratos fecais liofilizados da fêmea A de cachorro-do-mato-vinagre, dosadas pelo método de quimioluminescência, ao longo dos meses de março a dezembro de 2005.

Quando uma comparação com a Fig. 3 (dosagem pela quimioluminescência) é feita, pode-se observar que, das cinco maiores concentrações ilustradas, três coincidem com a Fig. 4, sendo estas as coletas 36 (agosto), 70 (novembro) e 85 (dezembro). Tal fato consegue mostrar que ambos os métodos são similares quando comparados.

Ao se analisarem as concentrações de progesterona apresentadas na Fig. 4, pode ser notado que as



maiores elevações ocorrem nas coletas 23 (julho), 41 (agosto) e 81 (dezembro), com os seguintes valores, respectivamente: 1.130,65; 1.130,65 e 1.136,36ng/g.

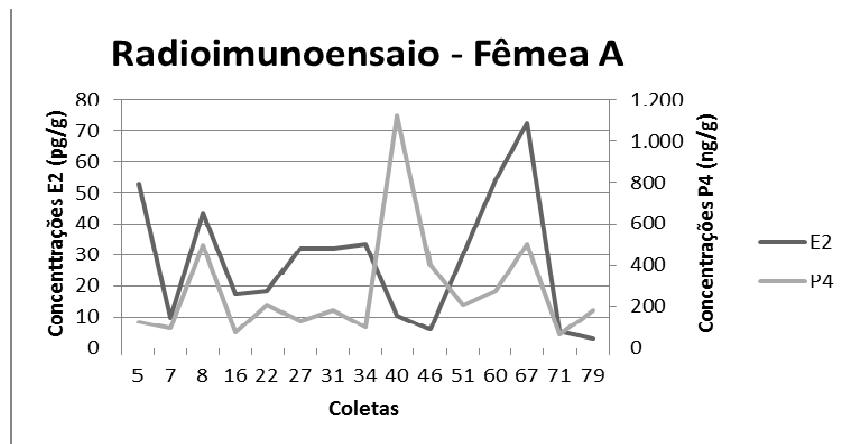


Figura 2. Concentrações hormonais de progesterona (P4) e estradiol (E2) encontradas em extratos fecais liofilizados da fêmea A de cachorro-do-mato-vinagre, dosadas pelo método de radioimunoensaio, ao longo dos meses de março a dezembro de 2005.

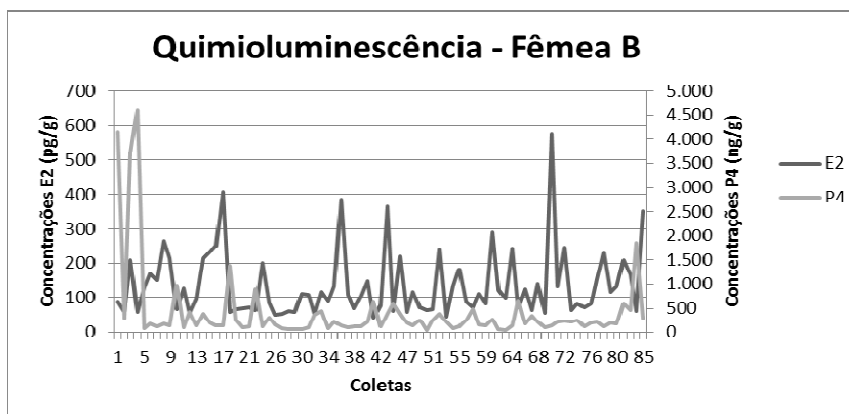


Figura 3. Concentrações hormonais de progesterona (P4) e estradiol (E2) encontradas em extratos fecais liofilizados da fêmea B de cachorro-do-mato-vinagre, dosadas pelo método de quimioluminescência, ao longo dos meses de março a dezembro de 2005.

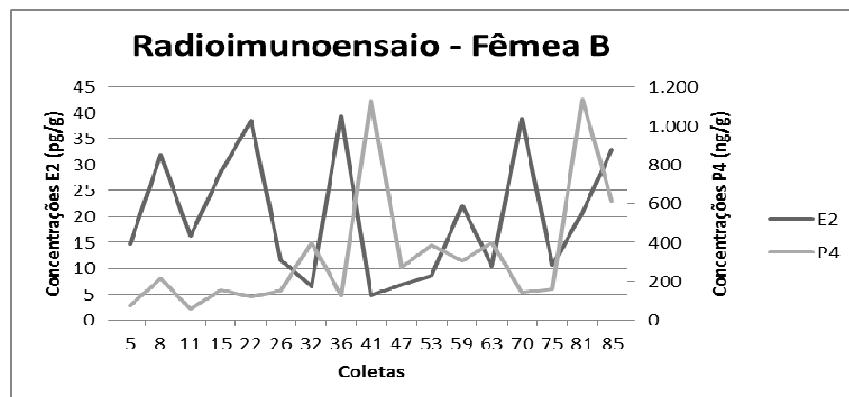


Figura 4. Concentrações hormonais de progesterona (P4) e estradiol (E2) encontradas em extratos fecais liofilizados da fêmea B de cachorro-do-mato-vinagre, dosadas pelo método de radioimunoensaio, ao longo dos meses de março a dezembro de 2005.



Pelas figuras 2 e 4, pode-se observar que, pelo método de radioimunoensaio, as fêmeas A e B obtiveram uma de suas amostras com maior concentração de progesterona, a coleta 23, feita no mesmo dia (04 de julho) para essas fêmeas. Isso pode ser explicado pelo convívio entre estas, já que as fêmeas A e B dividiam o mesmo recinto.

Ao se observar cada figura, pode ser notado que as concentrações hormonais detectadas em cada método de dosagem hormonal são proporcionais, mostrando que as elevações e as reduções das taxas dos hormônios são similares tanto pela quimioluminescência quanto pelo radioimunoensaio em cada fêmea.

Para detectar se existe uma sincronização entre as fêmeas que viviam em um mesmo recinto, é preciso que se aumente o período de coleta das amostras fecais por mais de um ano, além de se executarem essas dosagens também com as fêmeas vivendo em recintos diferentes.

Discussão

No trabalho de DeMatteo et al. (2006), no radioimunoensaio, os intervalos de progestinas fecais observados nas três fêmeas de cachorro-do-mato-vinagre estudadas foram de 184 a 3.506,67ng/g, de 300 a 1.553 ng/g e de 730 a 1.400ng/g, valores mais elevados do que os identificados no presente trabalho.

Porém, na literatura pesquisada, não foram encontrados valores referenciais padronizados na mensuração hormonal no ciclo reprodutivo de fêmeas dessa espécie.

Segundo Rao e Whittaker (1996), no caso de cachorros-do-mato-vinagre, mantidos em cativeiro, somente a fêmea do casal alfa copula, e essa fêmea dominante suprime o cio das fêmeas subordinadas.

Pesquisas que observaram o comportamento reprodutivo mostraram que cachorros-do-mato-vinagre em cativeiro não têm uma época específica de reprodução, como visto em canídeos de latitudes temperadas (Porton et al., 1987).

Para Nowak (1999), o padrão reprodutivo do cachorro-do-mato-vinagre é tido como não sazonal.

Cazes (2004) afirma que não foi possível chegar a uma conclusão quanto à existência de períodos reprodutivos específicos para o cachorro-do-mato-vinagre.

Pelo presente estudo, não se pode afirmar se existe um padrão de sazonalidade sem que haja um programa de coletas de amostras com um período mais extenso.

Monfort (2003) sugeriu, em seu trabalho, uma análise do extrato fecal por cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography* - HPLC) para a identificação dos metabólitos presentes nas fezes da espécie estudada, o que permite a utilização de uma metodologia de dosagem desses metabólitos que seja mais eficiente para esses animais.

De acordo com a análise estatística, entre os animais e entre as coletas, não existe diferença significativa ($P > 0,05$). A correlação entre os métodos de dosagem hormonal foi positiva e de alta magnitude, demonstrando que não existe diferença significativa entre estes ($P > 0,05$). Isto é, daria o mesmo resultado hormonal ao se utilizar tanto a quimioluminescência quanto o radioimunoensaio para a dosagem. Por isso, a eleição do método empregado estaria atrelada a diversos fatores, como o custo do *kit* utilizado para medir as concentrações dos hormônios, a disponibilidade do aparelho, ou mesmo o preparo das amostras para executar as dosagens, como, por exemplo, o procedimento de extração das amostras (Tab. 3).

Tabela 3. Correlação entre os métodos de radioimunoensaio e quimioluminescência de dosagem hormonal.

	P4 Qui	E2 Qui
P4 RIE	0,83	-
E2 RIE	-	0,90

Conclusão

Diante dos resultados encontrados pela dosagem hormonal dos metabólitos fecais, não foram observadas variações significativas entre as características observadas neste estudo, como a correlação entre os métodos utilizados, as duas fêmeas descritas e os hormônios.

Os métodos aplicados para a dosagem hormonal permitiram a verificação da ocorrência de um padrão cíclico entre essas fêmeas de cachorro-do-mato-vinagre, já que ambos forneceram, como resultados, concentrações suficientes para sugerir um ciclo estral nessa espécie.

Em conclusão, apesar de terem sido utilizados conjuntos diagnósticos comerciais específicos para dosagem hormonal em humanos, o presente estudo sugere a utilização dos métodos de quimioluminescência e radioimunoensaio para a quantificação dos metabólitos fecais de estradiol e progesterona na espécie *Speothos venaticus*, e inclusão da HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência - *High Performance Liquid Chromatography*), a fim de que se faça um estudo mais apurado dos metabólitos hormonais presentes no extrato fecal.



Agradecimentos

Ao prof. Alberto Magno, do Laboratório de Zootecnia e Nutrição Animal/UENF, aos responsáveis pelo Laboratório de Química e Funções de Proteínas e Peptídeos/UENF, ao prof. Olney V. da Mota e à técnica Solange Silva Samara, do Setor de Micologia do Laboratório de Sanidade Animal/UENF, por contribuírem no processo de liofilização autorizando a utilização dos equipamentos.

À profª. Maria Clara C. Bussiere, por autorizar a utilização do equipamento de quimioluminescência do Setor de Endocrinologia do Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal/UENF.

Referências

- Brown JL, Wildt DE, Wielbnowski N, Goodrowe KL, Graham LH, Wells S, Howard JG.** Reproductive activity in captive female cheetahs (*Acinonyx jubatus*) assessed by faecal steroids. *J Reprod Fert*, v.106, p.337-346, 1996.
- Cazes LB.** Análise dos eventos reprodutivos do *Speothos venaticus* (LUND, 1842) (Carnivora: canidae) (cachorro-do-mato-vinagre) em cativeiro. 2004. 25p. Monografia (graduação em Medicina Veterinária) Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2004.
- De Oliveira TG.** Distribution, habitat utilization and conservation of the vulnerable bush dog *Speothos venaticus* in northern Brazil. *Oryx The International Journal of Conservation*, v.43, p.247-253, 2009.
- De Boever J, Kohen F, Serreyn R, Vandekerckhove D, Van Maele G.** Application of chemiluminescence immunoassays for steroid hormones in clinical endocrinological investigations in women. *Anal Chim Acta*, v.170, p.125-131, 1985.
- Dematteo KE, Porton IJ, Kleiman DG, Asa CS.** The effect of the male bush dog (*speothos venaticus*) on the female reproductive cycle. *J Mammal*, v.87, p.723-732, 2006.
- Monfort SL.** Non-invasive endocrine measures of reproduction and stress in wild population. *In: Holt WV, Pickard AR, Rodger JC, Wild DE.* (Eds). *Reproductive Science and integrated Conservation*, Cambridge: Cambridge University Press, p.146-165, 2003.
- Nowak RM.** Walker's Mammals of the World. 6.ed., v.1 e 2. The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London, p.632-678, 1999.
- Porton IJ, Kleiman DG, Rodden M.** Aseasonality of bush dog reproduction and the influence of social factors on the estrous cycle. *J Mammal*, v.68, p.867-871, 1987.
- Rao SJ, Whittaker T.** Problems in hand-rearing a single Bush Dog. *International Zoo News*, v.43, p.222-227, 1996.
- Schwarzenberger F.** The many uses of non-invasive faecal steroid monitoring in zoo and wildlife species. *International Zoo Yearby*, v.41, p.52-74, 2007.
- Snyder NFR, Derrickson SR, Beissinger SR, Wiley JM, Smith TB, Tone WD.** Limitations of captive breeding in endangered species recovery. *Conservation Biol*, v.10, p.338-348, 1996.
- Wasser SK, Hunt KE, Brown JL, Cooper K, Crockett CM, Bechert U, Millsbaugh JJ, Larson S, Monfort SL.** A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. *Gen Comp Endocrinol*, v.120, p.260-275, 2000.
-