

MENSURAÇÃO DE METABÓLITOS FECAIS DE TESTOSTERONA EM GATO-MOURISCO (*Puma yagouaroundi*) NO PERÍODO PRÉ-PÚBERE E PÓS PÚBERE

LIMA, Marina Mendieta¹
RIBEIRO, Rodrigo Neca²

RESUMO

O presente trabalho realizado no Zoológico Danilo Jose Galafassi localizado no Município de Cascavel no Paraná tem como objetivo avaliar a puberdade nos períodos pré-púbere e pós-púbere utilizando os níveis de concentração de testosterona do gato mourisco (*Puma yagouaroundi*). O *Puma yagouaroundi* tem ampla distribuição no Brasil e habita florestas de planície e matas, restingas, cerrado, manguezais e plantações. Foram executadas as extrações fecais e analisadas através do teste enzimaimunoensaio (EIA) evidenciado um significativo aumento nas concentrações de metabólitos fecais de testosterona na fase pré-púbere. O uso de monitoramento endócrino não invasivo através de metabólitos se torna uma importante ferramenta para o perfil endócrino reprodutivo das espécies com fisiologia desconhecida ou pouco estudadas.

PALAVRAS-CHAVE: Gato- mourisco (*Puma yagouaroundi*), testosterona, enzimaimunoensaio.

1. INTRODUÇÃO

A população de animais silvestres tem sofrido ameaças de extinção sendo uma das principais causas a degradação ambiental provocada pelos desmatamentos, queimada gerada por produtos químicos que tem ligação direta com a redução e fragmentação do ecossistema, caça ilegal, tráfico de animais e desequilíbrios ecológicos causados pelo homem (ERDMANN, 2005). Nesse sentido a uniformidade gênica das espécies silvestres desencadeia uma série de fatores que interferem na extinção, entre eles a maior suscetibilidade a doenças e alterações espermáticas, assim diminuindo a fertilidade (ORSINI e BONDAN, 2006).

O gato-mourisco ou jaguarandi (*Puma yagouaroundi*) é um felino de pequeno porte pertencente à família *Felidae* de ordem Carnívora, tem ampla distribuição no Brasil e está listado como vulnerável à extinção das espécies ameaçadas no Rio Grande do Sul IUNC 2018 também está classificado como vulnerável pelo IBAMA (2018).

A família *Felidae* compõe 37 espécies sendo 36 animais silvestres. São animais predominantemente solitários, noturnos e carnívoros estritos, devido a isso são predadores essenciais ingerindo somente tecidos de origem animal (BERBARE, 2004). Dentre oito espécies de pequenos

¹Graduando em Medicina Veterinária pelo Centro Universitário da fundação Assis Gurgacz. E-mail: maliima@hotmail.com

² Médico Veterinário. Pós-graduado em CMCPA pelo Instituto Qualittas. Mestrando em Produção Sustentável e Saúde Animal UEM. Professor do Curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário da fundação Assis Gurgacz. E-mail: rodrigoribeiro@hotmail.com

felídeos temos o gato-mourisco, cuja distribuição envolve desde Sul do Texas até as províncias de Buenos Aires e Rio negro na Argentina e em todo o Brasil com exceção do Sul do Rio Grande do Sul (BERBARE, 2004).

Os métodos convencionais para obtenção de dados sobre perfil endócrino se baseia em análise de coletas de sangue. Esta abordagem é de difícil realização em animais silvestres, devido ao manejo, sendo assim as dosagens de metabólitos hormonais em excretas como fezes e urina torna-se método alternativo eficaz (HOYOS, 2013). Segundo Pereira (2007) nos últimos vinte anos muitos avanços foram adquiridos no melhoramento de métodos de qualificação de metabólitos urinários e fecais. O uso de análises de metabólitos fecais para o monitoramento não invasivo serve para inovar as pesquisa de espécies ameaçadas de extinção (BROWN et al,1996).

Com isso as pesquisas em animais silvestres vem tornando-se um método recente comum para estudos não invasivos sobre a fisiologia de animais de vida livre e de cativeiro. Serve tanto para fins reprodutivos quanto para bioindicador de bem-estar animal (BROWN, et al, 1996). Os protocolos de extrações apresentam-se cada vez mais simplificado, tendo como consequência a redução de mão de obra e diminuições de variações relacionadas a etapas de extração (PEREIRA, 2007).

O monitoramento hormonal e avaliação da resposta fisiológica ao estresse e ciclo reprodutivo é uma ferramenta fundamental para compreender e melhorar a saúde e bem-estar animal (CHELINI et al, 2006). Essas técnicas são muito utilizadas e suas vantagens bem conhecidas, eliminando a necessidade de contenção física e química do animal para um acompanhamento hormonal (BROWN, 2006). A avaliação do padrão hormonal em amostras fecais é de grande utilidade, pois possibilita a verificação do caráter comportamental e reprodutivo das espécies sem que haja interferência nas concentrações dos hormônios sexuais (LE MOS et al, 2015).

As técnicas utilizadas para análises pode ser enzimaímunoensaio (EIA) e a radioímunoensaio (RIA) devido ao fato de mensurar pequenas quantidades de hormônios. A radioímunoensaio é altamente sensível e o método mais comum para as análises hormonais, entretanto laboratórios de RIA precisam de licença para utilizar marcadores radioisótopos e equipamentos para detecção de radiação beta e gama, que possuem relativamente um custo alto. Em contraste as técnicas de enzimaímunoensaio não utilizam a radioatividade, os equipamentos são relativamente mais baratos e os reagentes são fáceis para o preparo.

O EIA é um teste tão sensível quanto RIA (BROWN, 2008). Esta técnica também possui desvantagens tendo uma delas a degeneração microbiana dos metabólitos hormonais após a defecação, grande número de metabólitos gerado a partir de um único hormônio e a necessidade de fazer a validação para cada espécie e grupo hormonal (STEIN, 2016). Também existe a cromatografia líquida, um método que tem a capacidade de separação e análises quantitativas de

uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras. Este tipo de cromatografia obteve um avanço significativo nos últimos anos, desde então vem obtendo novas sofisticções tecnológicas (VIEIRA *et al*, 2002).

Em cativeiro, as amostras fecais podem ser coletadas e congeladas em seguida, evitando o deterioramento das estruturas químicas presentes. As amostras de fezes assim como a maioria das amostras biológicas, são estáveis ao longo do tempo quando armazenadas a temperaturas abaixo de zero (KHAN *et al*, 2002). Estudos recentes demonstraram que o simples congelamento de amostras fecais em freezer convencional é uma das melhores opções para preservar os níveis hormonais por períodos prolongados (PEREIRA, 2007).

As fezes da maioria das espécies de vertebrados contêm metabólitos com praticamente todos os principais hormônios esteróides como: Progestágenos, estrógenos, andrógenos, glicocorticoides e mineralocorticoides que são metabolizados no fígado e secretados para o intestino via bile e suco biliar (HUNT *et al*, 2004). Os metabólitos de testosterona são excretados de modo quase exclusivo nas fezes de gatos machos (MONTEIRO, 2006).

Uma preocupação com o monitoramento hormonal através da utilização de fezes são que as mudanças na dieta e variações de água entre as amostras influenciam a concentração de esteróides fecais, sendo necessária a padronização da alimentação (CANDEIAS, 2014). A análise consiste na diluição dos metabólitos em solventes orgânicos, álcoois e éteres e soluções aquosas. Mas atualmente, a maioria dos pesquisadores utilizam o metanol com concentração 80% para extrações de metabólitos em mamíferos (ALTINO, 2018).

O monitoramento hormonal não invasivo por metabólitos fecais nos permite avaliar a puberdade em machos descrita como o momento da primeira espermatogênese ou a habilidade para ejacular e tem como objetivo saber se o animal está apto para reprodução (CZEKALA *et al*, 1994).

Esta pesquisa teve como objetivo avaliar a puberdade nos períodos pré-púbere e pós-púbere utilizando os níveis de concentração de testosterona do gato mourisco (*Puma yagouaroundi*).

2. MATERIAIS E METÓDOS

2.1 ANIMAL

Foi utilizado para o desenvolvimento do trabalho um macho da espécie *Puma yagouaroundi*, alocado em um recinto no setor extra do Zoológico Municipal Danilo Galafassi,

localizado na cidade de Cascavel, no estado do Paraná, Brasil. As coletas foram realizadas durante cinco meses, entre maio e setembro de 2018, coletando amostras frescas que posteriormente, depositadas em sacos plásticos do tipo *ziplock*, contendo o número da coleta e a data.

2.2 AMOSTRAS FECAIS

As amostras foram congeladas em *freezer* numa temperatura de -20°C no setor extra do parque, em seguida levadas para a PUCPR (Pontificia Universidade Catolica do Paraná-Campus Toledo) e acondicionadas em *freezer* na temperatura de -20°C.

2.3 EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS FECAIS

As amostras fecais foram descongeladas em temperatura ambiente e processadas seguindo o protocolo utilizado por Brown (2008). Foram analisadas ao total 24 amostras, sendo as 12 primeiras amostras referentes ao mês de maio e junho e as 12 últimas referentes ao mês de agosto e setembro, utilizando técnica imunológica de enzimaímmunoensaio (EIA) utilizada para mensurar pequenas quantidades de hormônios.

Com isso foi avaliado as concentrações de metabólitos fecais de testosterona. O método consistiu em colocar as amostras em tubos de ensaios indetificados de acordo com o saco plástico utilizado nas coletas. As amostras ficaram na estufa a 70°C por 72 horas até secarem totalmente e posteriormente retirou-se as fezes secas dos tubos de ensaio e feito a masseração do conteúdo.

As amostras passaram por uma peneira e em seguida foi realizado a pesagem obtendo o peso 0,2g de fezes secas. Após a pesagem acrescentou 5 mL de metanol 90 % (Metanol PA 90; H₂O 10) dentro de cada tubo. As amostras foram homogenizadas em Vórtex por 15 minutos em velocidade média e seguidamente centrifugadas a 3500 RPM durante 15 minutos.

Após a centrifugação foi recuperado 2 mL de sobrenadante em criotubo com tampa rosqueada junto com a indentificação das amostras.

2.4 PROTOCOLO DE EIA PARA TESTOSTERONA

O extrato fecal fora analisado por enzimaímunoensaio utilizando um protocolo descrito por Brown (2008). Foram utilizados anticorpos, utilizando placas comerciais específicas (*Testosterone* EIA-1559, DRG®Internacional, Inc.,EUA) afim de determinar o nível de metabólitos fecais de testosterona (MFT). As amostras foram inumeradas e organizadas em uma planilha, como base para facilitar o processo.

Adicionou-se 20 µL de solução tampão PBS ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 5,421 g/L; Na_2HPO_4 : 8,662 g/L; NaCl : 8,7 g/L; BSA: 1,0 g/L; pH 7,0) em cada poço. Em seguida foi acrescentado 200 µL conjugado em cada frasco com amostra e homogeneizado por 10 segundos, cobrindo e incubando a placa por 60 minutos.

Após a incubação as placas foram lavadas sendo posteriormente adicionado 100µL de Solução de lavagem em cada poço. Repetiu-se esse mesmo processo três vezes e logo depois incubou-se novamente por 15 minutos. Posterior aos 15 minutos foi adicionado 100 µL de “Stop Solution” em cada amostra e novamente incubado por mais 10 minutos. Para leitura realizada utilizou faixa 450 nm com equipamento automatizado (Biotek ELX800, Bio Tek Instruments, Inc., USA) com o programa de computador GEN5.

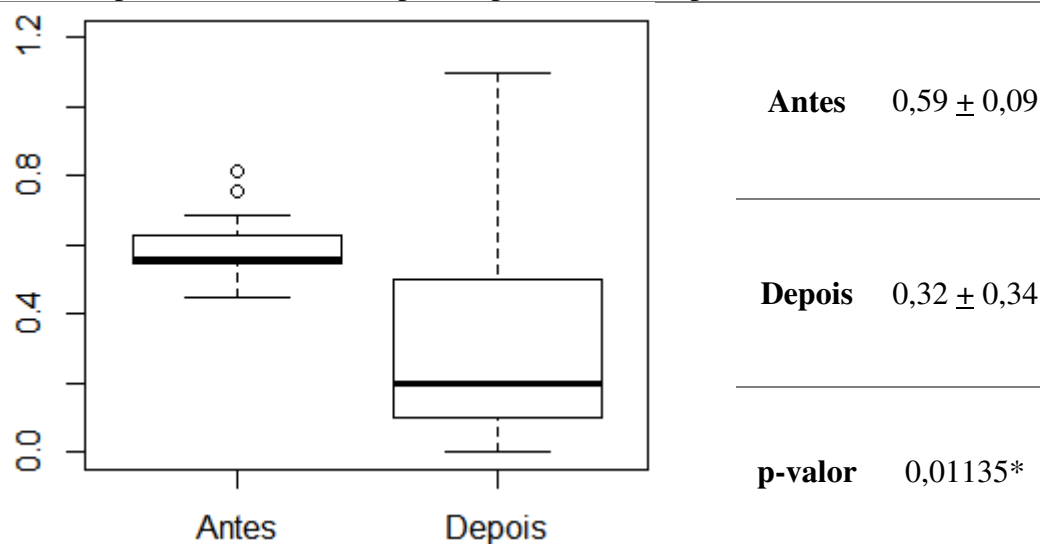
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após os términos das leituras, efetuaram-se as estatísticas descritivas e medidas de dispersão, com apresentação gráfica dos resultados. Os testes realizados foram de Shapiro-Wilk para normalidade com 95% de confiabilidade nos dados e caso não apresentassem normalidade, executou-se o teste de Wilcoxon pareado com 95% de confiabilidade. As análises foram processadas utilizando o software R versão 3.5.1(R Core Team, 2018). Como os dados não apresentaram normalidade realizou-se teste de Wilcoxon pareado com 95% de confiabilidade.

3. DISCUSSÃO

Como o p-valor foi $<0,05$ (Tabela 1) conclui-se que as populações não são idênticas, portanto há diferença significativa entre pré-puberé e o pós puberé.

Tabela 1 - Box-plot, médias e desvios padrão para os níveis e p-valor do teste de Wilcoxon pareado.



Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

Os valores referentes ao nível de testosterona pré- puberé foram de $0,59 \pm 0,09$ ng/g fezes secas que mostrou maior quando comparado ao nível de testosterona pós- puberé que foi de $0,32 \pm 0,34$ ng/g fezes secas, comprovando que havia picos de testosterona desde período pré-puberé e estes picos iram manter-se até a maturidade sexual.

A secreção de testosterona inicia-se na vida fetal para diferenciação embriológica dos órgãos genitais masculinos, porém é durante a puberdade que as células intersticiais tornam-se mais evidentes e funcionais (RUSSELL, 1996).

Os machos de gato-mourisco como as onças-pintadas e jaguatiricas segundo Sarti *et al* (2009) atinge a maturidade sexual entre 24 a 30 meses, ou seja, com 3 anos de idade. Contudo a expressão máxima da capacidade reprodutiva é essencial para que o macho atinja a maturidade sexual (PACHECO *et al*, 2009).

A puberdade nos felídeos machos está relacionada com a formação de espículas penianas que são indicadores de maior concentração de testosterona. Estas espículas podem começar a se desenvolver a partir de 12 semanas de idade (ERDMANN, 2005).

A puberdade quando comparada a outras espécies como os cervídeos é um processo transitório que se sujeita a vários fatores ambientais externos e internos, que influencia e interage com o sistema

nervoso central e modula o sistema endócrino que por consequência altera a idade cronológica no qual o animal se manifesta (MARTINS, 2012).

No estudo observou que no gato-mourisco entre os períodos púbere e pós-púbere a concentração sérica variou de 0,07 ng/dl até 1,1 ng/dl. Conforme Meyer (2013) a concentração sérica de testosterona em gatos domésticos pode variar desde 0,02 ng/dl podendo chegar á 18,2 ng/dl em animais adultos.

A concentração de testosterona em mamíferos está relacionada com a função e estrutura das células de Leydig. As células de Leydig são responsáveis pela produção de esteroides, demonstrando que a variação de secreção de testosterona resultou mais da capacidade individual destas células em secretar o hormônio (PAULA *et al*, 2002).

Quando comparado a ruminantes de acordo com Costa *et al* (2006) observou-se que os níveis de testosterona em capivaras (*Hydrochoerushydrochaeris*), apresentaram relações positivas e significativas com o volume das células Leydig.

Em carneiros Pacheco e Quirino (2010) relatou que as concentrações de testosterona estão relacionadas com as características seminais de carneiros jovens, classificados em dominantes e subordinados, observando que os animais machos dominantes possuíram mais peso, indicando assim que estes indivíduos alcançaram primeiro o processo de produção espermática.

Os picos de testosterona mantiveram-se maiores no período pré-púbere sendo o maior pico 0,8 ng/g fezes secas tendo relação com a presença da fêmea em cio no recinto antes das coletas. O comportamento reprodutivo pode ser influenciado por diversos fatores, como fêmeas em estro, idade, estresse, fatores hormonais e sociais. A testosterona nos machos é estimulada quando são colocados junto a fêmeas em estro (GONZALEZ *et al*, 1991).

Entre os fatores sociais a experiência sexual é a mais discutida entre os autores. De acordo com Pacheco *et al* (2010) o contato do macho com a fêmea pode oferecer aos machos praticas de execução de cópula ajudando no desenvolvimento do macho.

O nível de testosterona pós- puberé foi de $0,32 \pm 0,34$ ng/g fezes secas tendo diminuição. Esta diminuição está relacionada com o estresse gerado pela manipulação do individuo, o mesmo foi mantido em internamento devido a uma anemia severa gerada pela presença de pulgas. Este fator interfere na liberação de testosterona, aumentando o nível de cortisol, que afeta negativamente a liberação de LH interferindo consequentemente a produção de testosterona e a espermatogênese (SILVA, 2012).

Essa diminuição de concentração de hormônio está relacionada por diversos fatores sendo a principal causa à diminuição de hormônio luteinizante (LH). A produção de testosterona pelas células de Leydig é controlada através do LH, com a redução deste hormônio cessa a produção de testosterona

e leva a uma grande redução nos tamanhos das células de Leydig diminuindo a produção (MELLO, 2004).

Não foi possível fazer as análises de todas as amostras hormonais como sugerido. Não há relatos na literatura referente à idade de puberdade em gato- mourisco macho, mas com este trabalho identificou-se a puberdade com 10 meses de idade, mas há relatos de estudos da função ovariana de fêmeas mantidas em cativeiro que se constatou o início da puberdade com 20 meses (RODINI,2008).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O kit DRG *Testosterone* EIA-1559 foi eficaz identificando alterações endócrinas de andrógenos fecais, respectivamente, em macho de *Puma yagouaroundi*. Com este estudo também podemos concluir que o método não invasivo para monitoramento hormonal por meio de metabólitos fecais, proporciona uma importante informação sobre a puberdade de gato- mourisco e demonstrou utilidade. Visualizou-se um aumento significativo nas doze primeiras amostras concluindo que as deste indivíduo esteve com picos de testosterona desde a fase pré- púbere.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, L. B.; QUEIROLO, D.; BEISIEGEL, B. M.; OLIVEIRA, T. G. Avaliação do estado de conservação do gato- mourisco *Puma yagouaroundi* (É. Geoffroy Saint- Hilaire, 1803) no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, v. 3, n. 1, p. 99-106, 2013.
- ALTINO, V. S.; FILHO, S. L. G.; NOGUEIRA, S. S. C. Monitoramento não invasivo do estresse em animais selvagens mantidos em cativeiro. **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 19, n. 2, p. 119-128, 2018.
- BERBARI, P. E. B. **Avaliação longitudinal das concentrações de esteroides fecais em fêmeas de gato- mourisco**. Dissertação- (Mestrado em ciências veterinárias) Universidade de São Paulo, departamento de reprodução animal, 2004.
- BROWN, J. L. Comparative endocrinology of domestic and nondomestic felids. **Theriogenology**, n. 66, p. 25-36, 2006.
- BROWN, J.L. **Wildlife endocrinology manual**, 2008.
- BROWN, J.L. et al Reproductive activity in captive female cheetahs (*Acinoyx jubalus*) assessed by fecal steroid. **Journal of Reproduction fertility**, v. 106, p. 337- 346,1996.

CANDEIAS, I. Z. **Monitoramento não invasivo da ciclicidade ovariana em *Lycalopex vetulus***. Dissertação- Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2014.

CHELINI, M. M. et al Assessment of the physiologic stress response by quantification of fecal corticosteroids. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v.45, n.3, p.8–11, 2006.

COSTA, D. S.; PAULA, T. A. R.; MATTA, S. L. P. The intertubular compartment morphometry in capybaras (*Hydrochoerushydrochaeris*) testis. **Animal Reproduction Science**, 91, p.173-179, 2006.

CZEKALA, N. M. Fecal steroid hormone analysys as an indicator of reproductive function in the cheetah. **Zoo Biology**, v.13,p. 119-128,1994.

ERDMANN, R. H. **Exame reprodutivo, contenção farmacológica e criopreservação de sêmen em gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigris* Schreber, 1775)**. Dissertação- (Mestrado em ciências veterinárias)- Universidade Ferderal do Paraná, 2005.

GONGALEZ, R.; ORGEUR, P.; POINDRON P.; SIGNORET,J. P. The effects of sexual receptivity of females and the sexual experience of rams. **Reprod Nutr Dev**, v31, p.97-102, 1991.

HOYOS, M. A. E. **Caracterização da atividade ovariana no urso-de-óculos (*Tremarctos ornatus* *cuvier*) mediante análise de metabólitos fecais de esteroides sexuais**. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinaria e zootecnia. Departamento de reprodução, São Paulo,2013.

HUNT, K. E.; TRITE, A. W.; WASSER, S. K. Validation of a fecal glucocorticoid assay for Steller sea lions (*Eumetopias jubatus*). **Physiology & Behavior** , n.80, p. 595– 601, 2004.

LEMOES, G. G.; CUNHA, I. C. N.; CONFORTI, V. A.; BASTOS, R.; QUIRINO, C. R.; FAES, M. R. Concentração dos metabólitos de estradiol e progesterona fecais no cachorro-do-mato vinagre (*Speothos venaticus*) pelos métodos de radioimunoensaio e quimioluminescencia. **Rev. Brás. Reprod. Anim**, Belo horizonte, v.39, n2,p.289-295, 2015.

MARTINS, E. A. F. **Caracterização do sêmen, do plasma seminal e concentração sérica de testosterona em cervo sambar (*Cervus unicolor*) em cativeiro na primaveira**. Dissertação- (mestrado)Universidade do oeste paulista. Departamento de fisiopatologia animal, São Paulo, 2012.

MELLO,F. P. S. **Endocrinologia da reprodução do macho**. Programa de pós graduação em ciências veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004.

MEYER, K. B. **Função testicular em gatos domésticos (*Felis catus*): Atividade da enzima aromatase e aspectos sazonais da esteroidogênese e espermatogênese**. Dissertação- (mestrado)Universidade Federal do Paraná. Departamento de Fisiologia, Curitiba, 2013.

MONTEIRO, A, L, R, **Métodos não invasivos de monitoramento da fauna**. Dissertação- (Mestrado)- Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia FMVZ- UNESP- Campus Botucatu. Área reprodução animal, São Paulo, 2006.

ORSINI, H.; BONDAN. Fisiopatologia do estresse em animais selvagens em cativeiro e suas implicações no comportamento e bem-estar animal- revisão de literatura. **Rev Inst Ciênc Saude**, v. 24, n. 1, p. 7-13, 2006.

PACHECO, A.; OLIVEIRA, A. F. M.; QUIRINO, C. R.; LANDIM, A.V. Características seminais de carneiros de raça santa inês na pré-puberdade, puberdade e na pós- puberdade. **Ars veterinária**, Jaboticabal, São Paulo, v.25, n.2, 090-099, 2009.

PACHECO, A.; QUIRINO, C. R.; Comportamento sexual em ovinos. **Rev. Bras. Anim.** Belo Horizonte, v34, p.87-97, 2010.

PAULA, T. A.R.; COSTA, D. S.; MATTA, S. L.P.; Avaliação histológica quantitativa do testículo de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) adultas. **Biosele J.**v.18, n.1, p.121-136, 2002.

PEREIRA, R.J.G; Métodos não invasivo para análise hormonais aplicadas aos estudos de ecologia e etologia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 2007.

R Core Team (2018). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RUSSELL, L. D. 1996. Mammalian Leydig cell structure. In: Payne, A. H., Hardy, M. P., Russell, L. D. (eds). **The Leydig cell**. Cache River Press. Vienna, IL., cap. 10, p. 218-222.

SARTI, P.; PAULA, T. A. R.; MATTA, S. L. P.; FONSECA, C. C.; POLLI, G. O.; BALARINI, M. K.; MASCARENHAS, R. M. **Parâmetros biométricos corporais e testiculares de jaguatiricas (Leopardus pardalis) adultas**. Departamento de Veterinária. Universidade Federal de Viçosa. p.56(2):161-165,2009.

SILVA, A. A.; **Efeito dos fatores climáticos nos parâmetros seminais, nas proteínas do plasmaseminal, na concentração sérica de cortisol e testosterona e na temperatura escrotal em touros Nelore (Bos taurus indicus)**. Dissertação-(mestrado)-Universidade do oeste paulista. Departamento de fisiopatologia animal, São Paulo, 2012.

STEIN, I. V.; **Monitoramento das oscilações anuais nos níveis de testosterona plasmática e andrógenos fecais de machos de jararaca-ilhoa (Bothrops insularis) mantidos em cativeiro**. Dissertação (Mestrado)- Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2016.

VIEIRA, J. G.; NAKAMURA, O. H.; NOGUTI, K. O. Aplicação da cromatografia líquida de alta performace como método preparativo para a dosagem de esteroides hormonais por RIE: dosagem de 17OH- progesterona e diidrotestosterona. **Arq Bras endocrinol metab**, vol. 46, n1. 2002.